

**Studien zur Biosynthese von Sactipeptiden:
Charakterisierung der an der Thioetherbrückenbildung
beteiligten Radical SAM Enzyme AlbA und SkfB**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
(Hochschulkennziffer 1180)
vorgelegt von

Dipl.-Chem. Leif Flöhe
aus Hannover

Marburg an der Lahn 2014

Vom Fachbereich Chemie
Der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
am 03.11.2013 eingereicht.

Erstgutachter: Prof. Dr. M. A. Marahiel
(Philipps-Universität Marburg)

Zweitgutachter: Prof. Dr. W. Buckel
(Philipps-Universität Marburg)

Tag der Dissertation: 29.01.2014

für Lena, Karin und Dirk

Der Hauptteil der Arbeit wurde in folgenden Artikeln veröffentlicht:

Flühe L., Knappe T. A., Gattner M.J., Schäfer A., Burghaus O., Linne U. and Marahiel M.A. The radical SAM enzyme AlbA catalyzes thioether bond formation in subtilisin A. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, 8 (4), 350-357

Flühe L., Burghaus O., Wieckowski B.M., Gießen T.W., Linne U. and Marahiel M.A. Two [4Fe-4S]-Clusters containing radical SAM enzyme SkfB catalyzes thioether bond formation during the maturation of the sporulation killing factor. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135 (3), 959-962

Weitere Publikationen des Autors:

Flühe L. and Marahiel M.A. Radical-S-adenosylmethionine enzyme catalyzed thioether bond formation in sactipeptide biosynthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, 17 (4), 605-612

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	XIII
Abstract	XIV
Abürzungsverzeichnis	XV
1. Einleitung.....	1
1.1 Naturstoffe	1
1.1.1 Nicht-ribosomale Peptide.....	2
1.1.2 Ribosomale Peptide.....	3
1.1.3 Bacteriocine aus Gram-positiven Bakterien.....	5
1.2 Wichtige Klassen ribosomal synthetisierter Peptide	6
1.2.1 Sactipeptide	6
1.2.2 Lanthipeptide	14
1.2.3 Thiopeptide	18
1.2.4 Linaridine	21
1.2.5 Proteusine.....	21
1.2.6 Cyanobactine	23
1.2.7 Pyrrolochinolinchinon (PQQ)	25
1.2.8 Lasso peptide	26
1.3 Radical SAM Enzyme	28
1.3.1 Lysin-2,3-Aminomutase	32
1.3.2 Biotin-Synthase.....	34
1.3.3 Lipoyl-Synthase	35
1.3.4 Methylthiotransferasen	36
1.3.5 Molybdopterin-Cofaktor-Biosyntheseprotein A	38
1.3.6 Pyrrolochinolinchinon-Biosyntheseprotein E	39
1.3.7 Radical SAM Reifungsenzyme der Fe-Fe-Hydrogenase HydA	40
1.3.8 Radical SAM Enzyme, die Glycyl-Radikale generieren	42

1.3.9 Butirosin-Biosyntheseprotein N	44
1.3.10 Reifungsenzyme von Arylsulfatasen	45
1.4 Aufgabenstellung	47
2. Materialien	48
2.1 Geräte	48
2.2 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien	49
2.3 Oligonukleotide.....	51
2.4 Vektoren	60
2.4.1 pDG148	60
2.4.2 pET-28a(+)	61
2.4.3 pET-48b(+)	61
2.4.4 pETM-10.....	62
2.4.5 pX	62
2.5 Mikroorganismen	63
2.5.1 <i>Bacillus subtilis</i> 168	63
2.5.2 <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3).....	63
2.5.3 <i>Escherichia coli</i> TOP10	63
2.5.4 <i>Paenibacillus larvae</i> subsp. <i>larvae</i> BRL-230010.....	63
2.6 Kulturmedien.....	64
2.6.1 LB-Medium	64
2.6.2 HS- und LS-Medium	64
3. Methoden	66
3.1 Molekularbiologische Methoden.....	66
3.1.1 Präparation chromosomaler DNA aus <i>B. subtilis</i> 168	66
3.1.2 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	66
3.1.3 Herstellung von Expressionskonstrukten	67
3.1.4 Mutagenese.....	67
3.1.5 Chemische Transformation von <i>B. subtilis</i> 168	69

3.1.6 Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	70
3.2 Proteinchemische Methoden	70
3.2.1 Fermentation von <i>B. subtilis</i> 168 zur Produktion von Subtilosin A	70
3.2.2 Hetero- und Homologe Genexpression	70
3.2.3 Zellaufschluss	72
3.2.4 Proteinreinigung.....	72
3.2.5 Chemische Rekonstitution von Eisen-Schwefel-Cluster-haltigen Proteinen.....	77
3.2.6 Reinigung von Subtilosin A durch präparative HPLC	77
3.2.7 Reinigung von SerSkfA und von SerSkfA-Varianten durch analytische HPLC.....	78
3.3 Naturstoffextraktion.....	79
3.3.1 Extraktion von <i>B. subtilis</i> 168 Zellpellets mittels Methanol	79
3.3.2 Extraktion von Kulturüberständen mittels Amberlite XAD16.....	79
3.4 Biochemische Methoden.....	80
3.4.1 Spaltung der Trx-SkfA-Fusionsproteinvarianten mit der TEV-Protease	80
3.4.2 SAM-Spaltungsaktivitätsassays.....	80
3.4.3 Vorläuferpeptidmodifikationsassays	81
3.4.4 Thermolysinverdau	83
3.5 Analytische Methoden	83
3.5.1 Bestimmung des Eisengehalts von Proteinen	83
3.5.2 Bestimmung des Sulfidgehalts von Proteinen	84
3.5.3 Peptidmassenfingerabdruck	85
3.5.4 HPLC-MS.....	85
3.5.5 HPLC-HRMS	86
3.6 Spektroskopische Methoden	89
3.6.1 UV-Vis-Spektroskopie.....	89
3.6.2 EPR-Spektroskopie	89
3.7 Kristallisation.....	90
4. Ergebnisse	92

4.1 Studien zur Subtilosin A Biosynthese.....	92
4.1.1 Klonierung, Expression und Reinigung von AlbA.....	92
4.1.2 Reinigung der AlbA-Mutanten innerhalb des CXXXCXXC-Motivs	92
4.1.3 Bestimmung des Eisen- und Schwefelgehalts von AlbA und AlbA-Varianten.....	93
4.1.4 Bestimmung der SAM-Spaltungsaktivität von AlbA.....	94
4.1.5 Bestimmung der SAM-Spaltungsaktivität von den AlbA-Varianten	97
4.1.6 Spektroskopische Charakterisierung der in AlbA gebundenen Fe/S-Cluster	97
4.1.7 Massenanalytik des Subtilosin A Vorläuferpeptids SboA.....	100
4.1.8 Bestimmung der von AlbA katalysierten Modifikationen an SboA.....	101
4.1.9 Untersuchung der Regiospezifität von AlbA mit Hilfe von Thermolysin	104
4.1.10 Carboxypeptidaseverdau der dreifach verbrückten SboA-Spezies	107
4.1.11 Vorläuferpeptidmodifikationsassays mit SboA-Varianten.....	108
4.1.12 Modifikationsassays mit der leaderpeptidlosen SboA-Variante	110
4.1.13 Zeitabhängigkeit der Thioetherbrückenbildung in SboA.....	111
4.1.14 Identifikation der zweiten [4Fe-4S]-Clusterbindungsstelle in AlbA	112
4.1.15 Interaktionsstudien mit SboA, IISboA, AlbA und AlbA-Varianten	116
4.1.16 <i>In vivo</i> -System zur Analyse der Produktion von Subtilosin A-Varianten	117
4.2 Studien zur Biosynthese des Sporulation Killing Factors	122
4.2.1 Klonierung, Expression und Reinigung von SkfB.....	122
4.2.2 Expression und Reinigung der SkfB ^{C117A C121A C124A} -Mutante	123
4.2.3 Bestimmung des Eisen- und Schwefelgehalts von den SkfB-Spezies	123
4.2.4 Bestimmung der SAM-Spaltungsaktivität von SkfB.....	124
4.2.5 Spektroskopische Charakterisierung der in SkfB gebundenen Fe/S-Cluster	126
4.2.6 Herstellung des Vorläuferpeptids des Sporulation Killing Factors.....	129
4.2.7 Massenanalytik des SerSkfA Vorläuferpeptids	131
4.2.8 Vorläuferpeptidmodifikationsassays mit SerSkfA und SkfB	132
4.2.9 Vorläuferpeptidmodifikationsassays mit SerSkfA-Varianten	133
4.2.10 Modifikationsassays mit der leaderpeptidlosen SkfA-Variante.....	140

4.2.11 Identifikation der zweiten [4Fe-4S]-Clusterbindungsstelle in SkfB	141
4.2.12 Kristallisation von SkfB	144
4.3 Genomic Mining nach putativen Sactipeptiden.....	145
4.3.1 <i>Paenibacillus larvae. subsp. larvae</i> BRL-230010	145
4.3.2 <i>Dictyoglomus thermophilum</i> H-6-12	147
4.3.3 <i>Thermoanaerobacter italicus</i> Ab9.....	149
4.3.4 <i>Ruminococcus obeum</i> ATCC 29174	150
5. Diskussion.....	152
5.1 Charakterisierung der Radical SAM Enzyme AlbA und SkfB	152
5.1.1 Charakterisierung von AlbA und SkfB als Radical SAM Enzyme	152
5.1.2 AlbA und SkfB enthalten jeweils zwei [4Fe-4S]-Cluster.....	153
5.1.3 Bindungsmotiv der zweiten in AlbA und SkfB gebundenen [4Fe-4S]-Cluster.....	154
5.2 Studien zur Biosynthese von Subtilosin A.....	155
5.2.1 Modifikationsassays mit SboA.....	155
5.2.2 Zeitabhängigkeit der Thioetherbrückenbildung.....	157
5.2.3 Modifikationsassays mit SboA-Varianten	157
5.2.4 Ergebnisse des <i>in vivo</i> -System.....	160
5.3 Studien zur Biosynthese des Sporulation Killing Factors.....	161
5.3.1 Vorläuferpeptidmodifikationsassays mit SerSkfA	161
5.3.2 Modifikationsassays mit SerSkfA-Varianten der Akzeptorposition	162
5.3.3 Modifikationsassays mit SerSkfA-Varianten der Donorposition.....	164
5.3.4 Modifikationsassays mit der leaderpeptidlosen SkfA-Variante IISkfA.....	164
5.4 Mechanismus der Thioetherbrückenbildung	166
5.5 zukünftige Forschungsschwerpunkte	169
6. Literaturverzeichnis.....	172
7. Anhang.....	i
Danksagung	xxvii

Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
------------------------	---

Zusammenfassung

Sactipeptide sind eine neue Klasse ribosomal synthetisierter, meist bioaktiver Peptide, die aus 26 bis 35 proteinogenen Aminosäuren bestehen. Ihr charakteristisches Merkmal ist eine Thioetherbindung, die das Schwefelatom einer Cysteingruppe mit dem α -Kohlenstoffatom einer Akzeptoraminosäure verknüpft. Als Akzeptoren wurden bis zum jetzigen Zeitpunkt die Aminosäuren Phenylalanin, Threonin, Methionin, Asparagin, Serin, Alanin und Tyrosin identifiziert. Alle bekannten Sactipeptide verfügen über eine relativ starre helikale Struktur. Teilweise wird auch ein zyklisches Peptidrückgrat gefunden. Der Sporulation Killing Factor (SKF) verfügt neben der Thioetherbrücke über eine Disulfidbindung zwischen zwei Cysteinen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Biosynthese der Thioetherbildung in den Sactipeptide Subtilosin A und SKF untersucht. Es wurde gezeigt, dass die Bildung der Thioetherbrücken von den Enzymen AlbA (Subtilosin A) und SkfB (SKF) katalysiert wird. Diese beiden Proteine wurden als Radical SAM Enzyme identifiziert, da sie nur in der mit Eisen und Schwefel beladenen Form und nur unter reduktiven Bedingungen in der Lage sind *S*-Adenosylmethionin (SAM) in Methionin und das 5'-Deoxyadenosylradikal zu spalten. Des Weiteren wurde durch die Bestimmung des Eisengehaltes von Varianten der beiden Enzyme und auch durch spektroskopische Untersuchungen dieser Proteinvarianten gezeigt, dass AlbA wie auch SkfB zwei [4Fe-4S]-Cluster binden. Der über ein für Radical SAM Enzyme charakteristisches CXXXCXXC-Motiv gebundene [4Fe-4S]-Cluster ist für die Spaltung von SAM verantwortlich wohin gegen der andere [4Fe-4S]-Cluster eine wichtige Rolle in der Synthese des Thioethers spielt.

Durch Vorläuferpeptidmodifikationsassays mit und ohne Zugabe von Iodacetamid, die anschließend per HPLC-HRMS analysiert wurden, wurde gezeigt, dass die Enzyme jeweils für die Synthese der Thioetherbrücken in dem dazugehörigen Vorläuferpeptid (SboA, SkfA) verantwortlich sind. Durch Leaderpeptidlose SboA und SkfA-Varianten wurde gezeigt, dass die Reaktion den ersten Schritt in der jeweiligen Biosynthese bildet. Durch AlbA und SkfB-Varianten wie auch Interaktionsstudien mit AlbA, AlbA-Varianten und SboA wurde eine Wechselwirkung des zweiten gebundenen [4Fe-4S]-Clusters und dem Vorläuferpeptid nachgewiesen. Des Weiteren wurden SkfA-Varianten hergestellt die Fragen zur Substratspezifität im Bezug auf Donor- und Akzeptorposition in der SkfB katalysierten Reaktion beantworten sollten. Dabei wurde u.a. gezeigt, dass die Enzymklasse nicht in der Lage ist die Synthese von Etherbindungen zu katalysieren. Aufbauend auf den dabei erhaltenen Ergebnissen wurde ein vollständig neuer, über radikale Zwischenstufen verlaufender Mechanismus für die Synthese der Thioetherbindungen vorgeschlagen und verifiziert.

Abstract

Sactipeptides are a new class of ribosomal assembled and posttranslational modified, mostly bioactive peptides, which are assembled of 26 to 35 proteinogenic amino acids. Their characteristic feature is a thioether bond linking the sulfur atom of a cysteine residue with the α -carbon of an acceptor amino acid. Until now the amino acids phenylalanine, threonine, methionine, asparagine, serine, alanine and tyrosine were identified as acceptors. All known sactipeptides possess of an inflexible helical fold. Partial a cyclized peptide backbone is found. The sporulation killing factor (SKF) contains an additional disulfide bridge as posttranslational modification besides the sactipeptide like thioether linkage.

In this thesis the biosynthesis of the thioether bond formation in the sactipeptides subtilisin A and SKF was investigated. It was shown that enzymes AlbA (subtilisin A) and SkfB (SKF) catalyze the generation of the thioether linkages. These proteins were identified as radical SAM enzymes, as they were only able to catalyze the cleavage of *S*-adenosylmethionine into methionine and the 5'-deoxyadenosylradical under reductive condition and after the enzymes were fully loaded with iron- and sulfide-ions. Furthermore it was shown, that both enzymes contains two [4Fe-4S]-Clusters. Therefore the iron- and sulfur-content of the proteins and protein variants were measured. As well the proteins and protein variants were analyzed by several spectroscopic techniques. The [4Fe-4S]-Cluster, which is coordinated by the characteristic radical SAM enzyme like CXXXCXXC motif is responsible for the cleavage of SAM, whereas the second [4Fe-4S]-Cluster plays a key role during thioether bond formation.

By carrying out precursor peptide modification assays with and without the addition of iodoacetamide and subsequent HPLC-HRMS analysis, it was shown that AlbA and SkfB are able to catalyze the thioether linkage generation in the respective precursor peptide (SboA, SkfA). By assaying leaderpeptide less SboA and SkfA variants it was elucidated that the AlbA and SkfB catalyzed reactions are the first step during the biosynthesis of both sactipeptides. Precursor peptide modification assays with AlbA and SkfB variants, as well as interaction studies with AlbA, AlbA variants and SboA showed an interaction between the second [4Fe-4S]-Cluster and the precursor peptide. Additional assays with SkfA variants, which should address issues concerning the substrate specificity of SkfB towards the donor and acceptor positions, were carried out. Within these assays it was e.g. shown that the enzyme class is not able to catalyze the formation of an ether linkage. Based on the obtained results a completely new radical based mechanism for thioether bond formation during sactipeptide biosynthesis is proposed and verified.

Abürzungsverzeichnis

1b-SboA	einfach verbrücktes SboA
2b-SboA	zweifach verbrücktes SboA
3b-SboA	dreifach verbrücktes SboA
1b-SerSkfA	einfach verbrücktes SerSkfA
2b-SerSkfA	zweifach verbrücktes SerSkfA
5'-dA	5'-Desoxyadenosin
A	Adenin
A-Domäne	Adenylierungsdomäne
AG	Arbeitsgruppe
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
bp	Basenpaare
C	Cytosin
C-Domäne	Kondensationsdomäne
Da	Dalton
Cy-Domäne	Cyclisierungsdomäne
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DSMZ	Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
dsDNA	doppelsträngige DNA
DT	Natriumdithionit
DTT	1,4-Dithiotreitol
EDTA	<i>N,N,N',N'</i> -Ethylendiamintetraessigsäure
E-Domäne	Epimerisierungsdomäne
ESI	Electrospray-Ionisation
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FA	Ameisensäure (<i>formic acid</i>)
FPLC	schnelle Flüssigchromatographie (<i>fast performance liquid chromatography</i>)
G	Guanin
GRAE	Glycylradikal aktivierende Enzyme
h	Stunden
HEPES	2- <i>N'</i> -[<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)piperazinyl]-ethansulfonsäure

HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
L	Liter
LB-Medium	Lysogeny Broth Medium
LM	Lösungsmittel
M	Mol pro Liter
MCS	Multipler Klonierungsbereich (<i>multiple cloning site</i>)
MeOH	Methanol
min	Minuten
MS	Massenspektrometrie
NADH	Nikotinadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADPH	Nikotinadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
NMR	Kernresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
NRP	nicht ribosomal produziertes Peptid
NRPS	nichtribosomale Peptidsynthetasen
nt	Nukleotide
NFPA	Nonafluoropentansäure (<i>Nonafluoropentanoic acid</i>)
OD	Optische Dichte
OD _x	Optische Dichte bei x nm
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCP-Domäne	Peptidyl Carrier Protein
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PP _i	Pyrophosphat
R	organischer Rest
<i>RBS</i>	ribosomale Bindungsstelle
REase	Restriktionsendonuklease
RP	Ribosomales Peptid
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RSE	Radical SAM Enzym
RT	Raumtemperatur
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIM	<i>single ion mode</i>
SKF	<i>Sporulation Killing Factor</i>
ssDNA	Einzelstrang-DNA (<i>single stranded DNA</i>)

T	Thymin
TIC	<i>total ion count</i>
TB	Tris/Borat-Puffer
TFA	Trifluoressigsäure
T _m	Schmelztemperatur
t _R	Retentionszeit
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜNK	Übernachtkultur
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Aminosäure	3-Buchstabencode	1-Buchstabencode	M [g/mol]
Alanin	Ala	A	89
Arginin	Arg	R	174
Asparagin	Asn	N	132
Aspartat	Asp	D	133
Cystein	Cys	C	121
Glutamat	Glu	E	147
Glutamin	Gln	Q	146
Glycin	Gly	G	75
Histidin	His	H	155
Isoleucin	Ile	I	131
Leucin	Leu	L	131
Lysin	Lys	K	146
Methionin	Met	M	149
Phenylalanin	Phe	F	165
Prolin	Pro	P	115
Serin	Ser	S	105
Threonin	Thr	T	119
Tryptophan	Trp	W	204
Tyrosin	Tyr	Y	181
Valin	Val	V	117

1. Einleitung

1.1 Naturstoffe

Als Naturstoffe werden chemische Verbindungen natürlichen Ursprungs (Pflanzen, Mikroorganismen, Tiere, Pilze, usw.) verstanden, die eine biologische Aktivität besitzen. Von der menschlichen Gesellschaft werden diese seit Jahrtausenden für unterschiedlichste Zwecke, wie z. B. als Rauschmittel (Tetrahydrocannabinol aus *Cannabis*) oder als Pfeilgift für die Jagd (Curare, Lianen), verwendet (Verdine, 1996). Der Durchbruch der Naturstoffe als Pharmazeutika in der modernen Medizin wurde durch die Entdeckung des Penicillins im Jahr 1928 und dessen großindustrielle Produktion in den 1940er Jahren erzielt. Dadurch war es erstmals möglich, bakterielle Infektionen an operierten oder in Kriegen verletzten Personen gezielt zu behandeln und zu heilen (Fleming, 1980). Zur Zeit basieren etwa 60% der verwendeten Pharmazeutika auf Naturstoffen (Newman et al., 2003). Bei 50% der neu zugelassenen Medikamente in den Jahren 1985 bis 2006 handelte es sich um Naturstoffe oder dessen Derivate (Newman and Cragg, 2007). Unter anderen kann der hohe Anstieg der menschlichen Lebenserwartung im 20. Jahrhundert durch den hohen Einsatz dieser natürlichen Pharmazeutika begründet werden (Verdine, 1996). Das jährliche Marktvolumen der daraus resultierenden Produkte liegt bei ungefähr 40 Milliarden US-Dollar (Demain, 2009).

Das große biologische Potential der Naturstoffe liegt in ihrer hohen strukturellen Diversität begründet. Im Laufe der Evolution haben sich verschiedene biosynthetische Produktionsverfahren entwickelt, nach denen die Naturstoffe auch eingeteilt werden. So wird zwischen Alkaloiden, Terpenen, Polyketiden, Kohlenhydraten, Lipiden und Peptiden unterschieden. Die hohe strukturelle Komplexität untereinander basiert vermutlich auf der evolutionären Entwicklung der Biosynthesemaschinerien, die direkt mit den Veränderungen der Umweltbedingungen zusammenhängen (Singh and Barrett, 2006).

Bei vielen dieser Sekundärmetabolite handelt es sich um Peptide. Diese werden in drei Klassen eingeteilt: 1.) die ribosomal und postranslational modifizierten Peptide (RP), 2.) die nicht-ribosomal produzierten Peptide (NRP) und 3.) die Cyclodipeptide. Die Biosynthese von Cyclodipeptiden wird über Cyclodipeptid Synthasen katalysiert. Als Substrat dient mit Aminosäuren beladene tRNA (Aminoacyl-tRNA) (Giessen et al., 2013a; 2013b; Gondry et al., 2009). Auf die Biosynthese von ribosomal und nicht-ribosomal produzierten Peptiden wird in den nächsten Kapiteln eingegangen.

1.1.1 Nicht-ribosomale Peptide

Nicht-ribosomal synthetisierte Peptide werden, wie der Name schon impliziert, unabhängig vom Ribosom assembliert. Ihre Biosynthese verläuft an multimodularen Megaenzymkomplexen, den sogenannten nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen. Diese sind modular aufgebaut, d. h. dass in linearen NRPS-Systemen für jeweils eine eingebaute Aminosäure ein Elongationsmodul benötigt wird. Die Reihenfolge der Elongationsmodule bestimmt die Aminosäuresequenz des assemblierten Peptids. Als Beispiel ist in Abbildung 1.1 die nicht-ribosomale Peptidsynthetase von Bacitracin gezeigt. Der Megaenzymkomplex besteht aus 12 Modulen. Jedes Modul besteht dabei aus mindestens drei Domänen. Diese sind die Adenylierungsdomäne (A-Domäne), die Kondensationsdomäne (C-Domäne) und das Peptidyl Carrier Protein (PCP-Domäne).

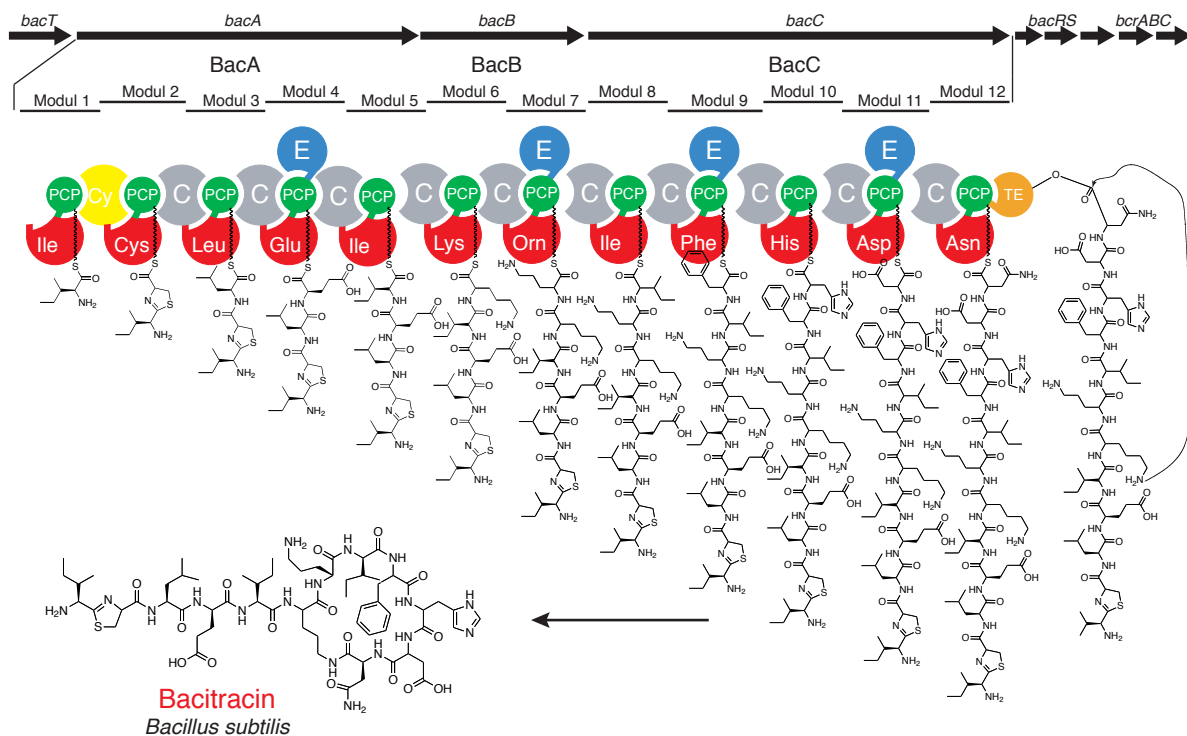


Abbildung 1.1: Schematische Übersicht über die nicht-ribosomale Peptidsynthetase von Bacitracin. Der für die Biosynthese verantwortliche Gencluster besteht aus den Genen *bacT*, *bacA*, *bacB*, *bacC*, *bacRS* und *bcrABC*, wobei die Gene *bacABC* die nicht-ribosomale Peptidsynthetase kodieren. Dessen modularer Aufbau und die an ihr ablaufende Biosynthese von Bacitracin sind im mittleren Abbildungsteil dargestellt. Die TE-Domäne von Modul 12 katalysiert die Bildung eines Makrolactamrings und somit die Freisetzung von Bacitracin, dessen Struktur im unteren Abbildungsabschnitt gezeigt ist.

Die Funktion der A-Domäne besteht in der Erkennung und Aktivierung der jeweiligen Aminosäure als Aminoacyl-Adenylat unter ATP Hydrolyse. Die so aktivierte Aminosäure wird anschließend auf die Thiofunktion des in der PCP-Domäne gebundenen Phosphopantetheinylarms übertragen. Durch den relativ bewegbaren Arm kann die, nun als Thioester aktivierte, Amino-

säure in weitere katalytisch aktive Domänen des Moduls, wie die C-Domäne, transportiert werden. Die C-Domäne katalysiert die Bildung der Peptidbindung, indem sie den nucleophilen Angriff der Aminogruppe, einer im nächsten Modul aktivierten Aminosäure, auf den Thioester ermöglicht. Die Elongationsmodule können neben den angesprochenen drei essentiellen Domänen über weitere Domänen verfügen. So werden in der Bacitracin-Synthetase Module mit Epimerisierungsdomäne (E-Domäne), Zyclisierungsdomäne (Cy-Domäne) und Terminationsdomäne gefunden. Die Terminationsdomäne katalysiert die Abspaltung des fertig assemblierten Peptids unter einer Zyclisierungsreaktion. Nicht-ribosomal synthetisierte Peptide verfügen über eine hohe strukturelle Diversität. Gründe dafür sind zum einen, dass A-Domänen auch nicht proteinogene Aminosäuren aktivieren können. Hinzu kommt, dass die aktivierten Aminosäuren durch spezifische Domänen am Megaenzymkomplex weiter modifiziert werden können. Des Weiteren konnte kürzlich gezeigt werden, dass der Strukturreichtum durch postsynthetische Modifikationen weiter erhöht wird (Marahiel, 2009; Sattely et al., 2008; Strieker et al., 2010).

1.1.2 Ribosomale Peptide

Im Gegensatz zu den nicht-ribosomalen Peptiden sind ribosomal synthetisierte Peptide aus den 20 proteinogenen Aminosäuren aufgebaut. Aus diesem Grund könnte davon ausgegangen werden, dass sie über eine geringere strukturelle Diversität wie NRPs verfügen. Dies ist jedoch falsch, da sie durch exzessive posttranslationale Modifikationen eine ähnlich hohe Strukturvielfalt wie nicht-ribosomal assemblierte Peptide erlangen (McIntosh et al., 2009). Es wird angenommen, dass 99% aller Bakterien mindestens ein ribosomales Peptid synthetisieren (Klaenhammer, 1988). Darüber hinaus wurden in allen Domänen biologischen Lebens Biosynthesecuster für diese Naturstoffklasse gefunden.

Die genetische Information, die für die Synthese eines ribosomalen Peptids benötigt wird, ist in Form eines Genclusters / Operons gespeichert. Der Gencluster besteht im Allgemeinen aus einem Vorläuferpeptidgen und Genen, die posttranslational modifizierende Enzyme, Exporter und Immunitätsproteine codieren. Der erste Schritt der Biosynthese eines RP ist die Transkription und Translation des Vorläuferpeptidgens in das Vorläuferpeptid. Dieses wird im nächsten Schritt durch die ebenfalls exprimierten Enzyme posttranslational modifiziert. Im letzten Schritt wird durch proteolytische Spaltung des Vorläuferpeptids der aktive Naturstoff erhalten. Dieser wird durch die in dem Operon codierten Exporter und Immunitätsproteine aus der Zelle geschleust. Eine schematische Übersicht der Biosynthese beinhaltet Abbildung 1.2 (Oman and van der Donk, 2009).

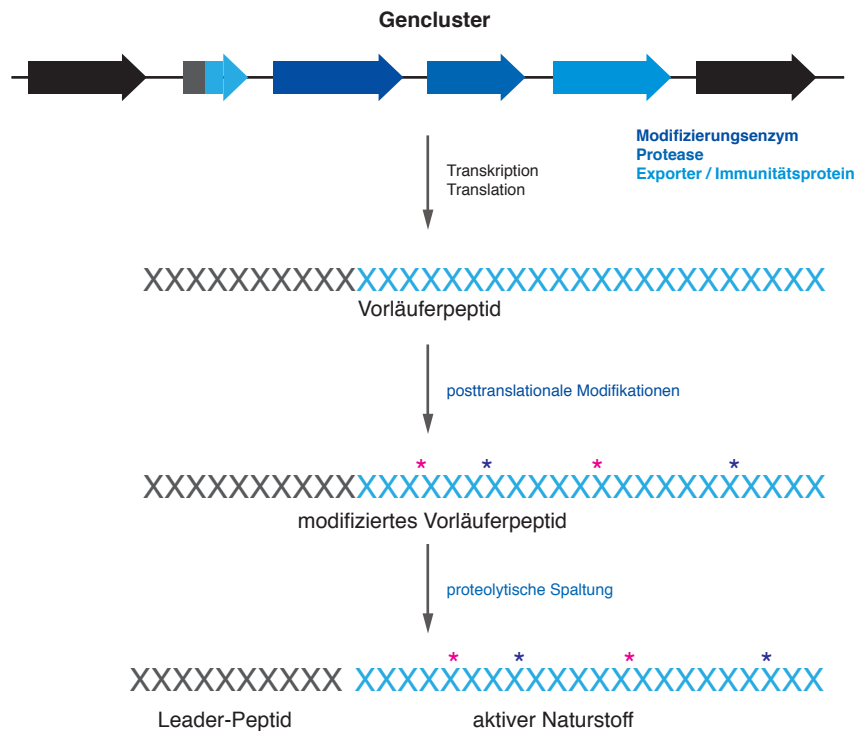


Abbildung 1.2: Schematischer Überblick der allgemeinen Biosynthese von ribosomal produzierten Peptiden. Das Operon bzw. der Gencluster, der für die Synthese des Naturstoffs verantwortlich ist, ist farbig hervorgehoben.

Das Vorläuferpeptid (Abbildung 1.3) setzt sich in den meisten bekannten Fällen aus einem N-terminalen Leaderpeptid und einem C-terminalen Corepeptid zusammen. Das Corepeptid bildet die Grundlage des zu produzierenden Sekundärmetaboliten. Das Leaderpeptid spielt bei der Prozessierung des Vorläuferpeptids eine große Rolle. So verläuft die Erkennung der Enzyme, die für die posttranslationale Modifikation des Corepeptids verantwortlich sind, meistens über die Leadersequenz. In Lanthipeptiden der Klasse I wird das Leaderpeptid für z. B. die Sekretion aus der Zelle benötigt. Eine weitere Funktion liegt darin, die biologische Aktivität des Vorläuferpeptids zu minimieren. In manchen Fällen verfügt der Vorläufer über zusätzliche Peptidsequenzen. So enthalten die meisten eukaryotischen Vorläuferpeptide eine zusätzliche N-terminale Signalpeptidsequenz. Diese dirigiert das Vorläuferpeptid z. B. im Fall von Conopeptiden (hochgiftige Kugelschneckengifte) in das endoplasmatische Retikulum (Craig et al., 1999). Darüber hinaus treten in Vorläuferpeptiden teilweise weitere C-terminale Sequenzen auf. Diese werden als Recognitionsequenz bezeichnet und spielen z. B. bei der Biosynthese von Cyanobactinen (Kapitel 1.2.6) eine wichtige Rolle (Oman and van der Donk, 2009).

Ein großer Vorteil ribosomaler Peptide gegenüber nicht-ribosomalen Peptiden ist die leichte Manipulation ihrer Sequenz und dadurch ihrer Struktur. So reicht bei ihnen für den Austausch einer Aminosäure die Mutagenese von maximal drei DNA-Basen. Bei nicht-ribosomalen Peptiden müssten dafür ganze Module mit einer Größe von 1500 – 3000 Nukleotiden ausgetauscht

werden. Es ist anzumerken, dass dies auch nur in den wenigsten Fällen möglich ist (Marahiel et al., 1997).



Abbildung 1.3: Allgemeiner Aufbau eines Vorläuferpeptids. Die für die Biosynthese essentiellen Leaderpeptid- und Corepeptidregionen sind in blau dargestellt. Die Sequenzen für ein Signalpeptid oder die Recognitionregion sind grau dargestellt. Sie werden nur in einem Teil der bekannten Vorläuferpeptide ribosomal produzierter Peptide gefunden.

1.1.3 Bacteriocine aus Gram-positiven Bakterien

Als Bacteriocine werden Peptide ribosomalen Ursprungs mit antimikrobieller Wirkung aus bakterieller Herkunft bezeichnet. Bacteriocine aus Gram-negativen Organismen werden in zwei Klassen eingeteilt: die Colicine mit einer Größe größer 10 kDa und die Microcine mit einer Größe kleiner 10 kDa (Duquesne et al., 2007). Bacteriocine aus Gram-positiven Organismen sind meistens kleiner als 8 kDa und werden zur Zeit in drei Klassen eingeteilt (Abbildung 1.4) (Maqueda et al., 2008; Nes et al., 2007; Oman and van der Donk, 2009).

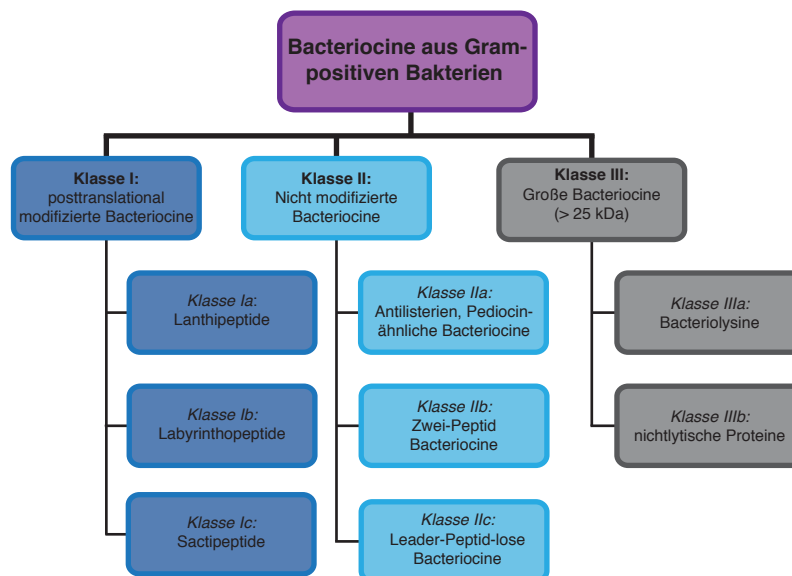


Abbildung 1.4: Übersicht über die aktuelle Klassifizierung von Bacteriocinen aus Gram-positiven Bakterien.

Klasse I setzt sich aus posttranslational modifizierten Peptiden zusammen. Dazu gehören Lanthipeptide (Klasse Ia), Labyrinthopeptide (Klasse Ib), die ebenfalls zu den Lanthipeptiden gezählt werden können (Kapitel 1.2.2), und Sactipeptide (Kapitel 1.2.1), dessen Biosynthese im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde. In Klasse II sind nicht modifizierte Bacteriocine einge-

teilt. Dazu zählen z. B. Pepdiocin PA-1 (Klasse IIa) aus *Lactococcus lactis* (Rodríguez et al., 2002) oder Leucocin A (Klasse IIa) aus *Leuconostoc gelidum* (Hastings et al., 1991). Bei ihnen handelt es sich um kleine, hitzestabile Peptide, die unter anderem in der Lebensmittelindustrie als Konservierungsmittel eingesetzt werden. Zu Klasse III der Bacteriocine zählen ungewöhnlich große Peptide mit einer Masse größer 25 kDa. Diese Klasse lässt sich weiter in nicht lytische Proteine (Klasse IIIb) und Bacteriolysine (Klasse IIIb) unterteilen. Zur Klasse IIIb gehört z. B. Lysostaphin aus *Staphylococcus simulans* (Bastos et al., 2009) das in der Lage ist, Zellwände Gram-positiver Bakterien abzubauen.

1.2 Wichtige Klassen ribosomal synthetisierter Peptide

Im Folgenden werden einige Klassen ribosomaler Peptide vorgestellt, die im Rahmen dieser Arbeit eine wichtige Rolle spielen.

1.2.1 Sactipeptide

Sactipeptide, ehemals als Sactibiotica bekannt (Murphy et al., 2011), sind eine relativ neue Klasse ribosomaler Peptide, die der Klasse Ic der Bacteriocine zuzuordnen sind (Arnison et al., 2012). Ihr charakteristisches Merkmal ist eine Thioetherbindung, in der der Schwefel einer Cysteingruppe mit dem α -Kohlenstoffatom einer Akzeptoraminosäure verknüpft ist. Bis jetzt sind fünf Peptide dieser Klasse zuzuordnen, die in den nächsten Abschnitten detailliert beschrieben werden. Alle gefundenen Sactipeptide stammen aus *Bacillus*-Spezies (Arnison et al., 2012). In kürzlich veröffentlichten bioinformatischen Studien konnten weitere Gencluster, die voraussichtlich in der Biosynthese von Sactipeptiden involviert sind, identifiziert werden. So wurden 15 neue Cluster durch Blast Analysen mit den beiden putativen Radical SAM Enzymen des *trn*-Operons (Kapitel 1.2.1.4) gefunden (Murphy et al., 2011). Darüber hinaus konnten Haft et al. zeigen, dass es wahrscheinlich auch Systeme gibt, die in der Lage sind, Peptide mit Selenoethern zu generieren (Haft and Basu, 2011).

1.2.1.1 Subtilosin A

Subtilosin A ist ein von mehreren *Bacillus*-Stämmen produziertes Sactipeptid (Sutyak et al., 2008a). Es wird unter Stressbedingungen, die meistens am Ende der exponentiellen Wachstumsphase auftreten produziert. Erstmalig wurde es 1985 aus *Bacillus subtilis* 168 isoliert und beschrieben (Babasaki et al., 1985). Es ist damit das am längsten bekannte Mitglied der RP-Klasse. Es konnte gezeigt werden, dass es aus 35 Aminosäuren besteht. Die Struktur des Peptids konnte in der Studie wegen nicht ausreichender Daten nicht bestimmt werden. Dies gelang erst 18 Jahre später durch NMR-Experimente mit ^{15}N markiertem Ausgangsmaterial (Kawulka et al., 2003; Marx et al., 2001). Es zeigte sich, dass Subtilosin A über ein zyklisiertes Pep-

tidrückgrat und drei Thioetherbrücken verfügt, in denen jeweils der Schwefel einer Cysteingruppe mit dem α -Kohlenstoffatom einer gegenüberliegenden Aminosäure verknüpft ist (Abbildung 1.5). Im Detail: Die Aminosäuren Cys4 und Phe31, Cys7 und Thr28 und Cys13 mit Phe22 sind jeweils über solch eine Bindung verknüpft. Der Abstand der Donor- und Akzeptoraminosäuren ist jeweils identisch, so dass eine längliche, an eine α -Helix erinnernde, Struktur entsteht. Die absolute Konfiguration der Akzeptoraminosäuren wurde durch reduktive Desulfurierung bestimmt (Kawulka et al., 2004). Es stellte sich heraus, dass die Konfiguration der beiden Phenylalanine invertiert wurde, wohin gegen die Konfiguration des Threonins unverändert zum Vorläuferpeptid blieb.

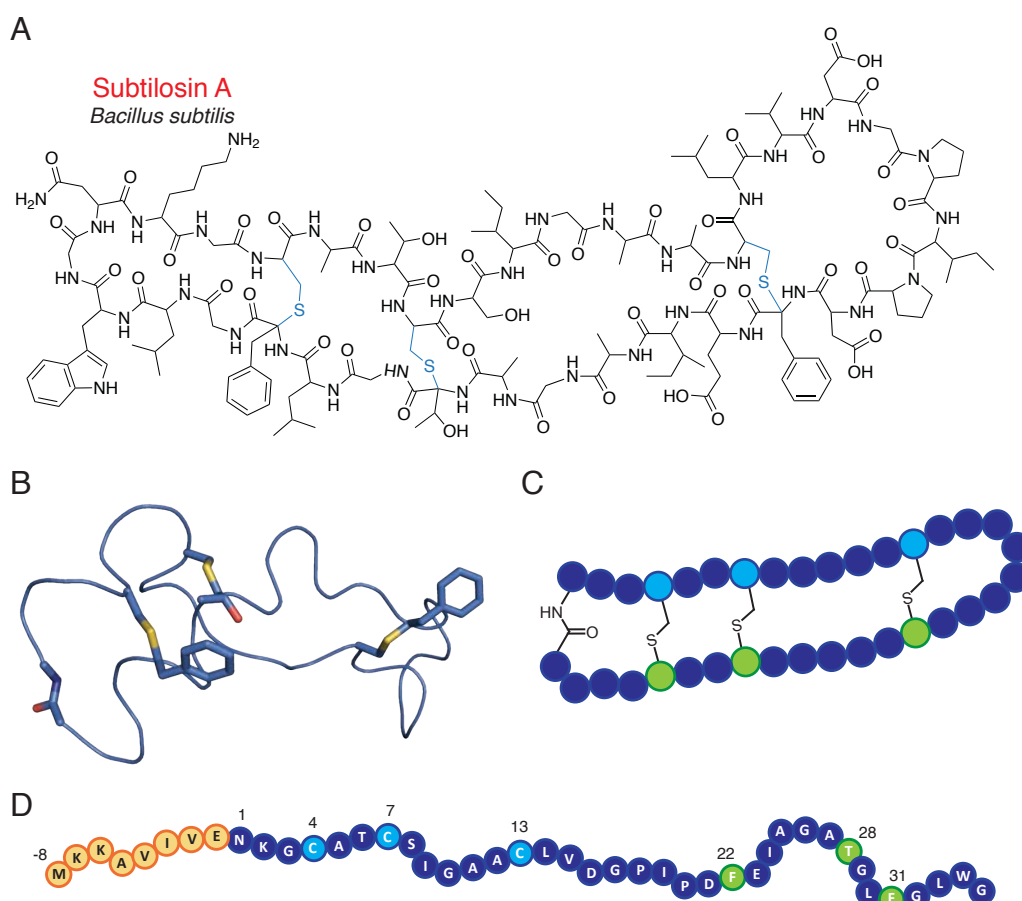


Abbildung 1.5: Übersicht über die Struktur von Subtilosin A und der Sequenz des Subtilosin A Vorläuferpeptids SboA. (A) Strukturformel von Subtilosin A. Die Thioetherbrücken sind blau hervorgehoben. (B) Dreidimensionale NMR-Struktur von Subtilosin A. Das zyklische Peptidrückgrat und die Thioetherbrücken sind hervorgehoben. (C) Kugelmodell der Struktur von Subtilosin A. Die Akzeptoraminosäuren der Thioetherbindung sind in grün und die Cysteindonoren in hellblau gekennzeichnet. (D) Kugelmodell und Sequenz des Subtilosin A Vorläuferpeptids SboA. Das Leaderpeptid ist gelb markiert.

Subtilosin A konnte eine antimikrobielle Aktivität nachgewiesen werden, die sich in erster Linie gegen Gram-positive Bakterienstämme richtet. In einigen Fällen konnte auch eine Aktivität ge-

genüber Gram-negativen Stämmen festgestellt werden. Unter den Bakterien finden sich auch einige pathogene Stämme. Der Einsatz von Subtilosin A als Breitbandantibiotikum kommt aber nicht in Frage, da die zu verwendende Dosis zu hoch für eine Anwendung bei Menschen wäre (Shelburne et al., 2007). Die antibakterielle Aktivität basiert aller Voraussicht nach auf der Permeabilisierung von Zellmembranen. In Experimenten mit Modell-Phospholipid-Doppelschichten konnte gezeigt werden, dass sich Subtilosin A in diese einlagern kann. Dies ist mit dem amphipatischen Charakter des Peptids zu erklären (Abbildung 1.6) (Maqueda et al., 2008; Thennarasu et al., 2005). Darüber hinaus wirkt Subtilosin A spermizidal (Silkin et al., 2008). Der Einsatz als Spermizid wird getestet, da Subtilosin A ebenfalls über eine Aktivität gegenüber *Gardnerella vaginalis*, dem Haupterreger bakterieller Vaginose, verfügt (Sutyak et al., 2008b). Vor kurzem war es möglich, durch Austausch von Thr6 gegenüber Isoleucin, eine Subtilosin A-Variante mit hämolytischer Aktivität zu generieren. Dadurch wurde gezeigt, dass sich die Biosynthesemaschinerie von Subtilosin A für die Synthese neuartiger Antibiotika eignet (Huang et al., 2009).

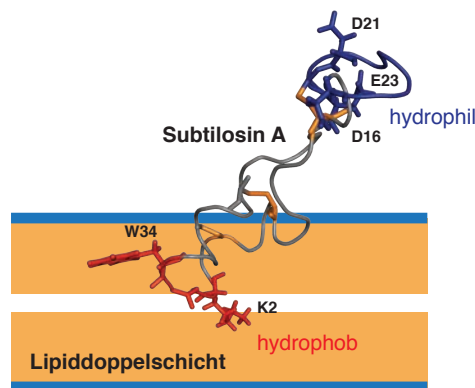


Abbildung 1.6: Modell für die Wechselwirkung von Subtilosin A mit einer Lipiddoppelschicht. Die Aminosäuren die für die amphipatischen Eigenschaften des Peptids verantwortlich sind, sind farblich hervorgehoben.

Der für die Biosynthese von Subtilosin A verantwortliche Gencluster (Abbildung 1.7) wurde im Jahr 1999 in *B. subtilis* JH642 identifiziert (Zheng et al., 1999). Er besteht aus zwei vorläuferpeptidcodierenden Genen (*sboA*, *sboX*) und sechs weiteren Genen (*albA* – *albG*). In *in vivo*-Studien von Zheng et al. konnten den Genprodukten Funktionen zugewiesen werden: So handelt es sich bei SboA um das 43 Aminosäuren lange Vorläuferpeptid. Das Leaderpeptid besteht demnach aus 8 Aminosäuren. SboX, einem zu Vorläuferpeptiden ähnlichen Protein (50 AS), konnte keine Funktion zugeordnet werden. Die Sequenz besitzt auch keine Cysteingruppen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Genprodukte von *albA*, *albE* und *albF* für die postrationalen Modifikationen von SboA und die Genprodukte von *albB*, *albC* und *albD* für

den Export bzw. die Immunität gegenüber Subtilisin A verantwortlich sind. AlbG konnte keine Funktion zugeordnet werden (Zheng et al., 2000).

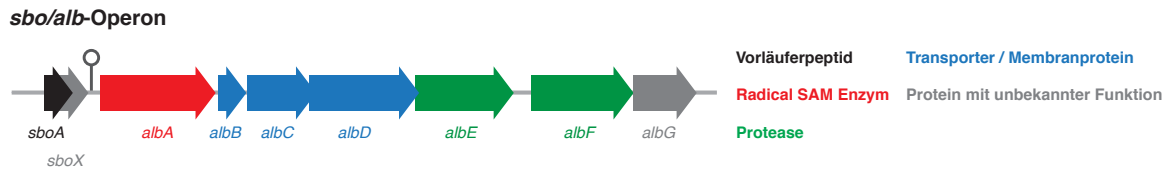


Abbildung 1.7: Organisation des *sbo/alb*-Operons, das für die Synthese von Subtilisin A verantwortlich ist.

Schon damals wurde vermutet, dass AlbA, ein zu NifB und PqqE homologes Enzym, für die Biosynthese der Thioetherbrücken verantwortlich ist. In der Diplomarbeit von Michael Gattner konnte zunächst gezeigt werden, dass es sich bei AlbA um ein Radical SAM Enzym handelt, also der Enzymklasse zugehörig zu der auch NifB und PqqE gehören (Gattner, 2010). Erste Anzeichen, dass es tatsächlich für die Biosynthese der Thioetherbrücken verantwortlich ist, wurden in der Diplomarbeit von Leif Flühe aufgezeigt (Flühe, 2010). Die Funktionen der beiden putativen Zink-abhängigen Proteasen AlbE und AlbF ist weiterhin unklar. Es wird davon ausgegangen, dass sie die Abspaltung des Leaderpeptids und die Zyklisierung des Peptidrückgrates katalysieren (Flühe et al., 2012).

1.2.1.2 Sporulation Killing Factor

Der Sporulation Killing Factor (SKF) ist ein von *B. subtilis* PY79 und *B. subtilis* 168 produziertes zirkuläres Peptid, das eine wichtige Funktion während der Sporulation und beim sogenannten bakteriellen Kannibalismus (Abbildung 1.8) besitzt (González-Pastor et al., 2003). Unter nährstofflimitierenden Bedingungen wird in einem Teil einer *B. subtilis*-Population das Regulatorprotein Spo0A phosphoryliert. Dadurch wird der Sporulationsvorgang eingeleitet. In Studien aus dem Jahr 2003 konnte gezeigt werden, dass phosphoryliertes Spo0A die Transkription des *sdp*- und *skf*-Operons aktiviert. Es kommt in den Zellen, in denen Spo0A aktiv ist, zu Produktion und Export des Sporulation Delay Proteins (SDP) und des Sporulation Killing Factors. Bei SDP handelt es sich ebenfalls um ein kleineres Peptid (42 AS), das über eine Disulfidbrücke verfügt. Die beiden Komponenten sind anschließend für die Lyse von *B. subtilis*-Schwesterzellen, in denen Spo0A nicht aktiviert wurde, verantwortlich. Diese Zellen sind nicht in der Lage, die zur Verteidigung benötigten Immunitätsproteine zu exprimieren. Durch Zerstörung der Zellmembranen wird neue Nahrung für die in der Sporulation befindlichen Zellen geliefert. Sie sind dadurch in der Lage, den energieintensiven Sporulationsvorgang aufzuschieben. Daher wird auch angenommen, dass Spo0A nur in einem Bruchteil der Zellen aktiviert wird. Des Weiteren wird vermutet,

dass die Kombination aus SDP und SKF ebenfalls in der Lage ist, weitere Bakterienstämme zu töten. Damit wäre sichergestellt, dass sich die entwickelten Sporen unter optimalen Bedingungen regenerieren können, falls wieder Nahrung vorhanden ist (González-Pastor et al., 2003; Piggot and Hilbert, 2004).

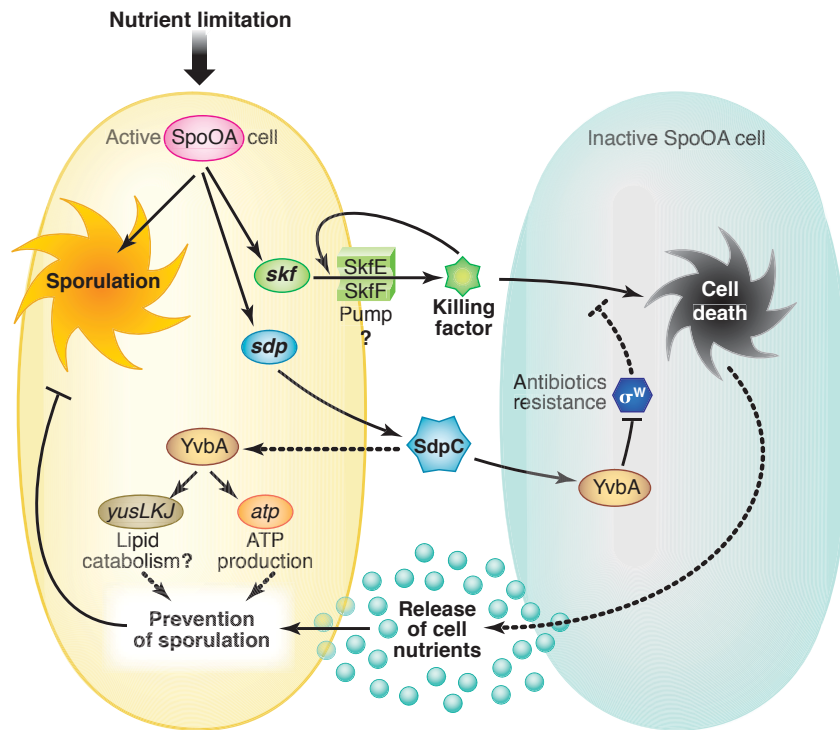


Abbildung 1.8: Vorgänge in *B. subtilis* 168 vor Eintritt in die Sporulation, die zur Produktion des Sporulation Killing Factors (SKF) und des Sporulation Delay Proteins (SdpC) führen. Die Auswirkungen der beiden Naturstoffe aus Zellen, die sich nicht in der Sporulation befinden, sind ebenfalls dargestellt. Eine genaue Beschreibung der Ereignisse findet sich im Text (Engelberg-Kulka and Hazan, 2003).

Die genauen Rollen von SDP und SKF während der Sporulation sind noch nicht vollständig geklärt. Der, in der im Jahr 2003 veröffentlichten Studie, gemachte Vorschlag, dass es sich bei SKF um ein stark toxisches Peptid handelt, konnte nach dessen Isolierung nicht bestätigt werden. Es zeigte sich sogar, dass SDP einen viel stärkeren Einfluss auf das Zellwachstum besitzt. Darüber hinaus verfügt SDP auch über regulatorische Eigenschaften, durch die es in der Lage ist, die Antibiotikaresistenz zu kontrollieren (Liu et al., 2010). Die Struktur des Sporulation Killing Factors (Abbildung 1.9a) konnte im Jahr 2010 durch NMR-Studien bestimmt werden. Es handelt sich um ein zirkuläres aus 26 Aminosäuren bestehendes Peptid, das über drei Cysteine verfügt. Zwei dieser Cysteine (Cys1 und Cys16) bilden eine Disulfidbrücke aus, wohingegen der Cysteinrest Cys12 mit der Aminosäure Met12 eine für Sactipeptide typische Thioetherbrücke ausbilden (Liu et al., 2010).

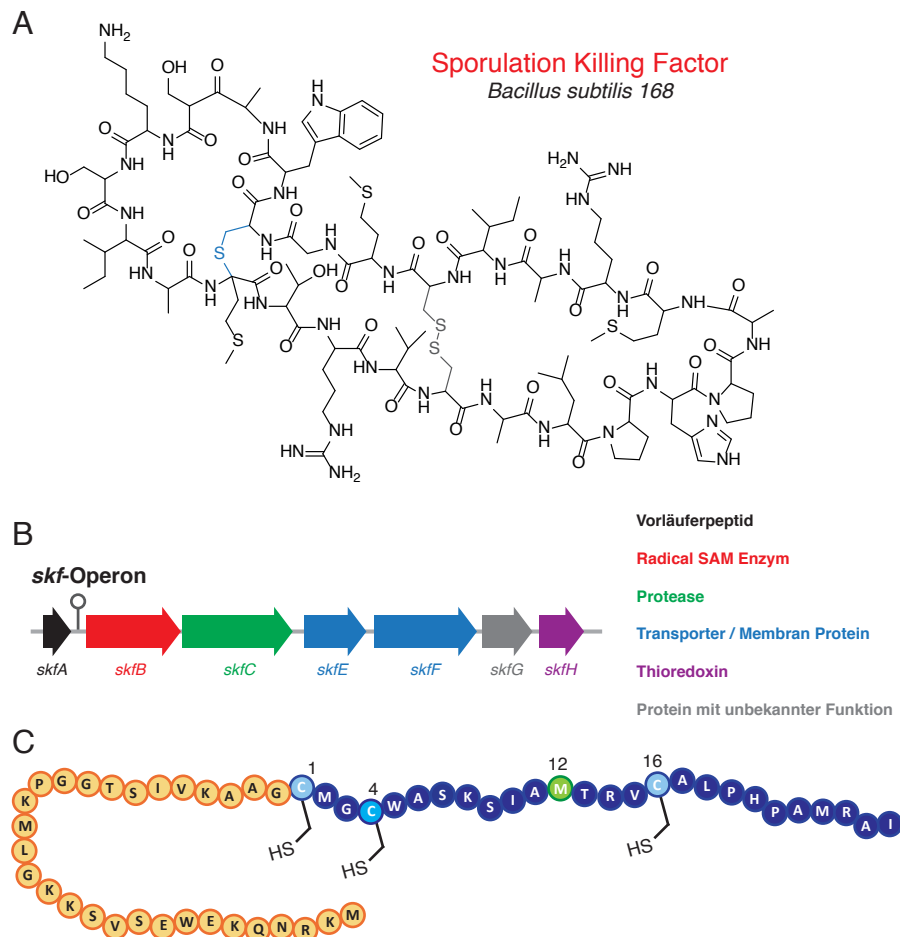


Abbildung 1.9: Struktur des Sporulation Killing Factors und Organisation des *skf*-Operons. (A) Strukturformel des Sporulation Killing Factors. Die Thioetherbrücke ist in blau, die Disulfidbrücke in grau dargestellt. (B) Genorganisation des *skf*-Operons. Es verfügt über ein Radical SAM Enzym. (C) Kugelmodell und Sequenz des SKF Vorläuferpeptids SkfA. Das Leaderpeptid ist gelb markiert.

Die Organisation des *skf*-Operons ist in Abbildung 1.9b gezeigt. Der Gencluster verfügt insgesamt über sieben Gene. Den Genprodukten sind folgende Funktionen während der Biosynthese zugeordnet: Bei SkfA handelt es sich um das 55 Aminosäuren lange Vorläuferpeptid. Das Leaderpeptid besteht daher aus 29 AS. SkfB konnte in der Diplomarbeit von Leif Flühe als Radical SAM Enzym identifiziert werden. Es ist vermutlich für die Generierung des Thioethers verantwortlich. Bei SkfC handelt es sich um eine putative membranständige Protease, die voraussichtlich die Abspaltung des Leaderpeptids und die Zyklisierung des Peptidrückgrats katalysiert. SkfH ist ein putatives Thioredoxin, von dem angenommen wird, dass es in die Synthese der Disulfidbrücke involviert ist. Die beiden Proteine SkfE und SkfF sind voraussichtlich am Export von und an der Immunität gegenüber SKF beteiligt. SkfG besitzt keine Homologie zu bekannten Proteinen. Seine Funktion ist daher unbekannt (González-Pastor et al., 2003).

1.2.1.3 Thurincin H

Thurincin H (Abbildung 1.10a&b) ist ein von *B. thuringiensis* SF361, einem erstmalig aus Sonnenblumenhonig isolierten Bakterium, produziertes Sactipeptid (Lee et al., 2009a). Es besteht aus 31 Aminosäuren. Das Peptidrückgrat ist im Gegensatz zu Subtilosin A und SKF nicht zyklisiert. Des Weiteren verfügt das Peptid über vier Thioetherbrücken, in denen jeweils die Aminosäuren Cys4 und Ser28, Cys7 und Thr25, Cys10 und Thr22 sowie Cys13 und Asn19 verknüpft sind. Zwischen den Verknüpfungen liegen immer zwei Aminosäuren, ähnlich wie in Subtilosin A. Die daraus resultierende dreidimensionale α -helikale Struktur ähnelt daher auch der von Subtilosin A (Sit et al., 2011b). Erste Untersuchungen zur antibakteriellen Wirkung von Thurincin H wurden ebenfalls durchgeführt. Es war gegen alle getesteten *Bacillus*-Spezies aktiv, nicht jedoch gegen Gram-negative Bakterien. Thurincin H ist wie Subtilosin A amphipatisch und könnte daher auch mit Zellmembranen interagieren und in diese einlagern (Lee et al., 2009a).

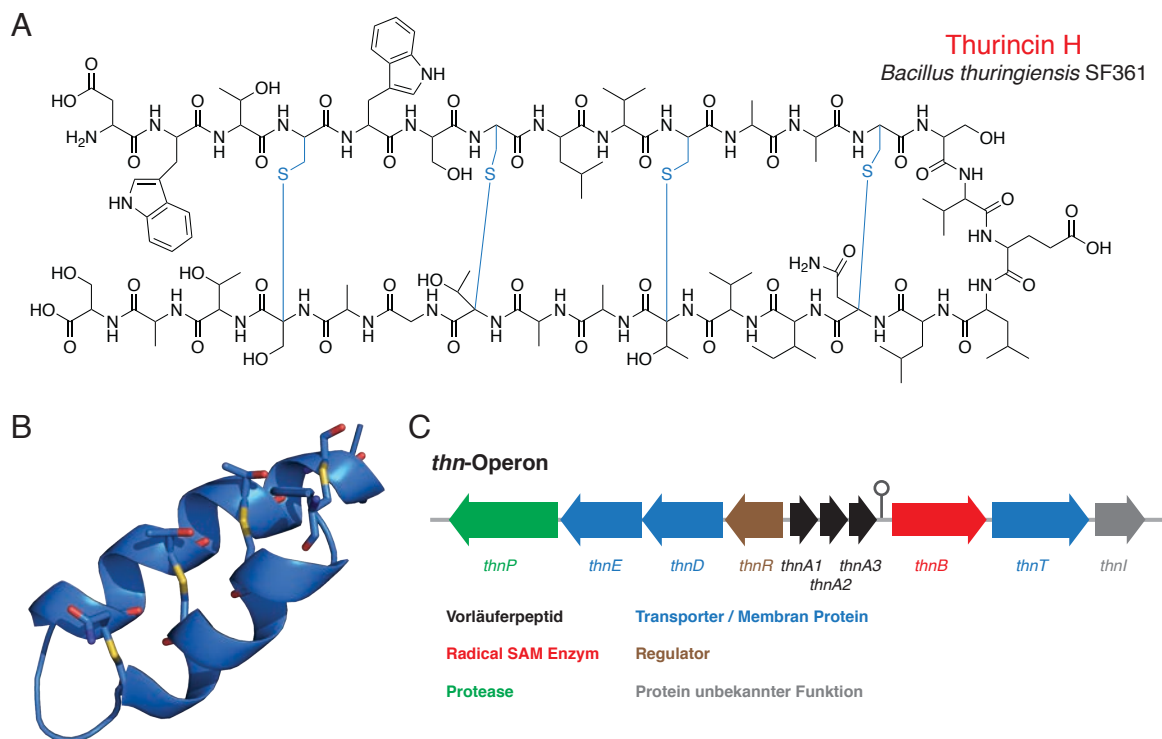


Abbildung 1.10: Übersicht über Thurincin H. (A) Strukturformel von Thurincin H. (B) Dreidimensionale, mittels NMR-Spektroskopie gelöste, Struktur von Thurincin H. (C) Überblick über das *thn*-Operon. Interessant ist, dass der Cluster über drei Vorläuferpeptidgene verfügt, die jeweils die gleiche Aminosäuresequenz verfügen.

Der für die Biosynthese verantwortliche Gencluster wurde im Jahr 2009 von Lee et al. identifiziert (Abbildung 1.10c) (Lee et al., 2009a). Das charakterisierte *thn*-Operon besteht aus 10 Genen, von denen drei Vorläuferpeptide codieren (*thnA1* – *thnA3*). Interessant ist, dass alle drei Vorläuferpeptide jeweils aus 40 AS bestehen und eine identische Aminosäuresequenz besitzen.

zen. Des Weiteren wird im Cluster ein Genprodukt codiert, das kürzlich als Radical SAM Enzym identifiziert wurde. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass es für die Synthese der vier Thioetherbrücken verantwortlich ist (Boß, 2012; Wieckowski). Die weiteren Gene codieren für eine putative Protease (ThnP), drei putative Exporter- bzw. Immunitätsproteine (ThnE, ThnD und ThnT), ein Regulatorprotein (ThnR) und ein Protein unbekannter Funktion (ThnI). Die putative Protease ist aller Voraussicht nach für die Abspaltung des neun Aminosäuren langen Leaderpeptids verantwortlich. Bei den aus anderen *Bacillus* Stämmen isolierten Peptiden Thuricin 17, Thuricin S, Bathuricin F4 und Cerein handelt es sich wahrscheinlich auch um Thurincin H (Sit et al., 2011b).

1.2.1.4 Thuricin CD

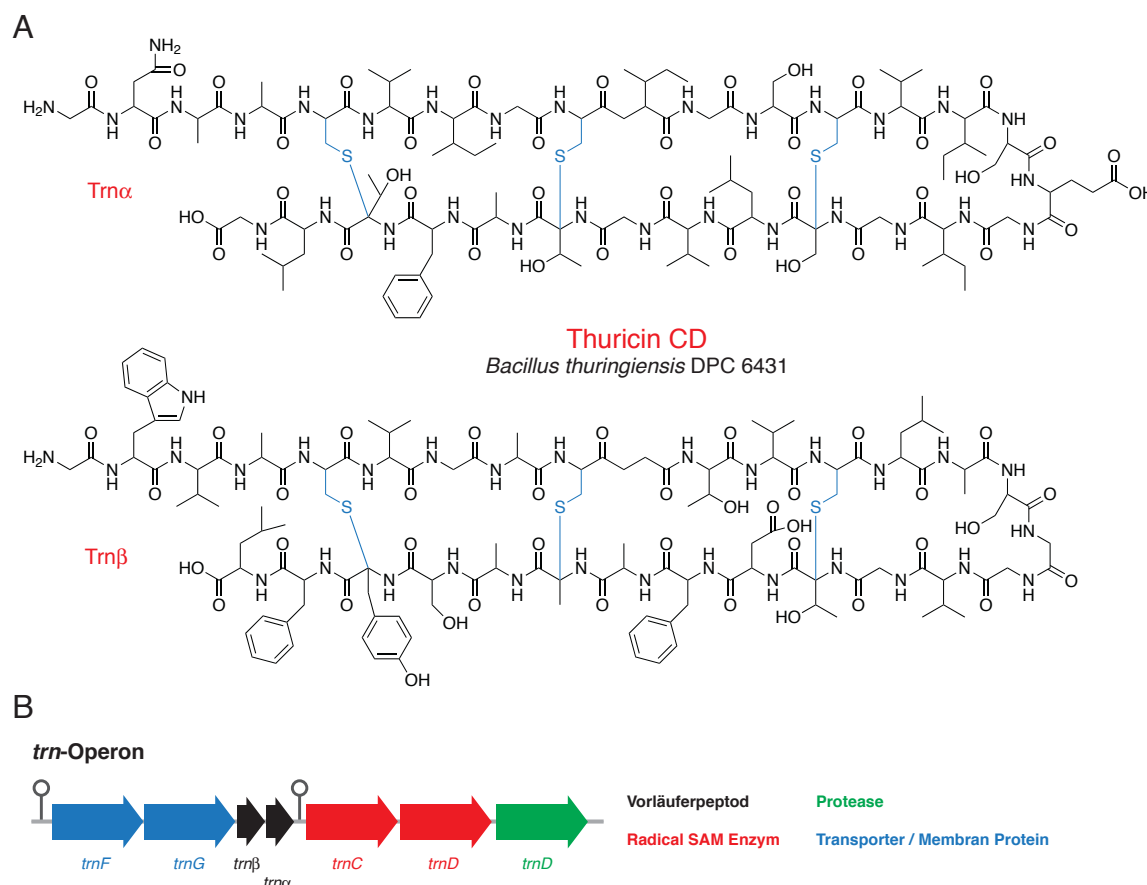


Abbildung 1.11: Übersicht über Thuricin CD. (A) Strukturformeln von Trn α und Trn β , die zusammen Thuricin CD bilden. Die beiden Verbindungen bestehen aus jeweils 30 Aminosäuren. Der Abstand der Thioetherbindungen untereinander beträgt immer drei Aminosäuren. (B) Organisation des trn-Operons. Interessant ist, dass pro Vorläuferpeptidgen ein Gen für ein putatives Radical SAM Enzym codiert ist.

Bei Thuricin CD handelt es sich um eine aus *B. thuringiensis* DCP 6431 isolierte Mischung zweier Sactipeptide: Trn α und Trn β . Beide Peptide bestehen jeweils aus 30 Aminosäuren, ihr Peptidrückgrat ist wie bei Thurincin H nicht zyklisiert und sie verfügen jeweils über drei Thio-

etherbindungen (Rea et al., 2010). Es sind jeweils die Cysteinreste Cys5, Cys9 und Cys13 mit dem α -Kohlenstoff der Akzeptoraminosäuren an Positionen 21, 25 und 28 verknüpft. Zwischen den Bindungen liegen jeweils drei Aminosäuren. Das hat zur Folge, dass Trn α und Trn β wie auch Subtilosin A und Thurincin H über eine α -helikale Struktur verfügen (Abbildung 1.11a) (Sit et al., 2011a). Thuricin CD könnte eine Anwendung als Antibiotika finden, da in ersten Studien eine spezifische antimikrobielle Aktivität gegenüber pathogenen *Clostridium difficile*-Stämmen nachgewiesen werden konnte (Rea et al., 2010). Der für die Biosynthese beider Peptide verantwortliche Gencluster besteht aus sieben Genen (Abbildung 1.11b). Die beiden Strukturgene *trn α* und *trn β* codieren für die Vorläuferpeptide, die eine Länge von 47 bzw. 49 AS besitzen. Die Leaderpeptide bestehen danach aus 17 bzw. 19 Aminosäuren und sind daher in der Länge zwischen den Leaderpeptiden von Thurincin H bzw. Subtilosin A und dem Sporulation Killing Factor einzuordnen. Interessant ist, dass im *trn*-Operon zwei putative Radical SAM Enzyme (TrnC, TrnD) codiert sind, jeweils eins pro Vorläuferpeptid. Darüber hinaus verfügt der Gencluster noch über eine putative Protease (TrnE) und zwei putative Exporter (TrnF und TrnG). TrnE ist voraussichtlich für die Abspaltung des Leaderpeptids bei beiden Vorläuferpeptiden verantwortlich (Rea et al., 2010).

1.2.2 Lanthipeptide

Das 1928 entdeckte Nisin A (Abbildung 1.12) ist eins der am längsten bekannten Peptide ribosomalen Ursprungs und gehört zur Klasse der Lanthipeptide (Gross and Morell, 1971; Rogers and Whittier, 1928). Es ist der am Besten studierte Vertreter dieser Naturstoffklasse und wird seit über 40 Jahren in der Nahrungsmittelindustrie als Konservierungsmittel verwendet (Lubelski et al., 2008). Wegen seiner antibakteriellen Eigenschaften kann Nisin A ebenfalls als Lantibiotikum, einem biologisch aktiven Peptid dieser Klasse (Schnell et al., 1988), bezeichnet werden. Das charakteristische Merkmal von Lanthipeptiden ist das Vorhandensein von Thioetherbrücken, in denen der Schwefel eines Cysteinrestes mit einem β -Kohlenstoffatom eines Alanin- oder Methylalaninrestes verknüpft ist. Der Name der RP Klasse leitet sich von den bei der Biosynthese generierten Lanthionin- (Lan) bzw. 3-Methyllanthioninresten (MeLan) ab (Abbildung 1.13a&b). Vor kurzem wurde ein neuer Typ von Lanthipeptiden entdeckt, der über Labioninreste (Lab) verfügt (Abbildung 1.13c). Die ribosomale Herkunft der Naturstoffklasse wurde erst im Jahr 1988 für Epidermin durch die Sequenzierung des für die Synthese verantwortlichen Gencluster bestätigt (Schnell et al., 1988), nachdem dies schon in den 1970er Jahren vermutet wurde (Ingram, 1970). Kurze Zeit später wurden auch die Vorläuferpeptidgene für weitere Lanthipeptide wie Nisin (Buchman et al., 1988), Subtilin (Banerjee and Hansen, 1988) oder Pep5 (Kalletta et al., 1989) identifiziert.

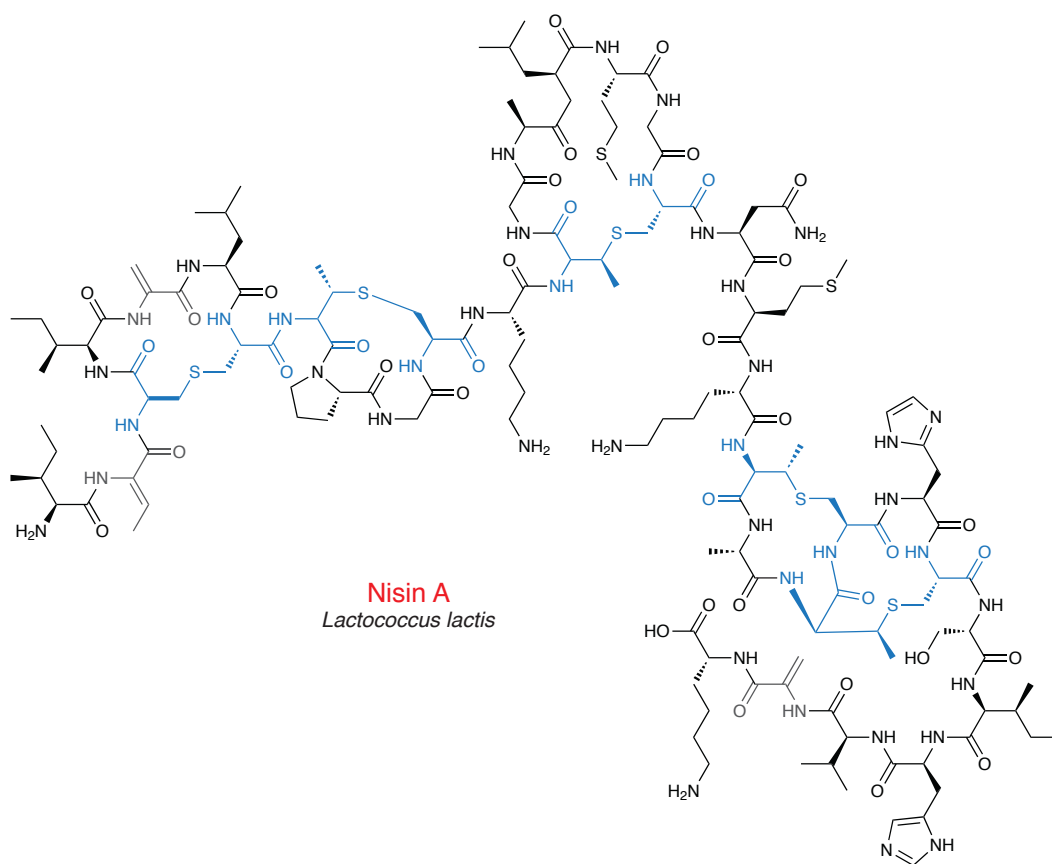


Abbildung 1.12: Struktur von Nisin A. Die Lanthionin- bzw. 3-Methyllanthioninreste sind blau hervorgehoben.

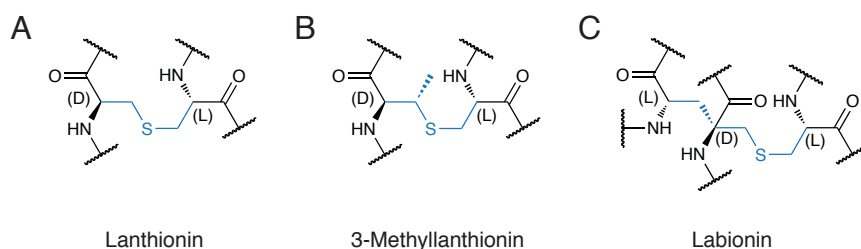


Abbildung 1.13: Überblick über die Thioetherverbrückten Aminosäuren in Lanthipeptiden. Strukturen von (A) Lanthionin (Lan), (B) 3-Methyllanthionin (MeLan) und (C) Labionin (Lab) (Knerr and van der Donk, 2012).

Die Biosynthese der Thioetherbrücken verläuft in zwei Schritten (Abbildung 1.14) (Chatterjee et al., 2005; Goto et al., 2010; Müller et al., 2010), durch posttranslationale Modifikation des jeweiligen Vorläuferpeptids. Zur Synthese der Lan bzw. MeLan-Reste werden im ersten Schritt die AS Dehydroalanin (Dha) bzw. Dehydrobutyrin (Dhb) durch Dehydratisierung von Serin- oder Threoninresten des Vorläuferpeptids generiert. In den meisten Fällen wird dazu die Hydroxylgruppe zunächst durch eine Kinaseaktivität phosphoryliert. Dadurch bildet sich für die anschließende Eliminierung eine bessere Abgangsgruppe (Phosphat). Im zweiten Schritt werden die Thioetherbrücken durch eine Michael-Addition der Cysteinreste an das β -Kohlentstoffatom

der dehydratisierten Aminosäuren generiert. Anschließend wird das dabei erzeugte negativ geladene Intermediat protoniert. Es entstehen Lan und MeLan. Die Biosynthese der Labioninreste verläuft über einen ähnlichen Mechanismus. Hier wird das, im letzten Schritt generierte negativ geladene Intermediat nicht direkt protoniert, sondern reagiert mit einem weiteren Dha-Rest unter Bildung einer C-C-Bindung. Das dabei erzeugte Intermediat wird anschließend unter Bildung eines Labioninrestes protoniert.

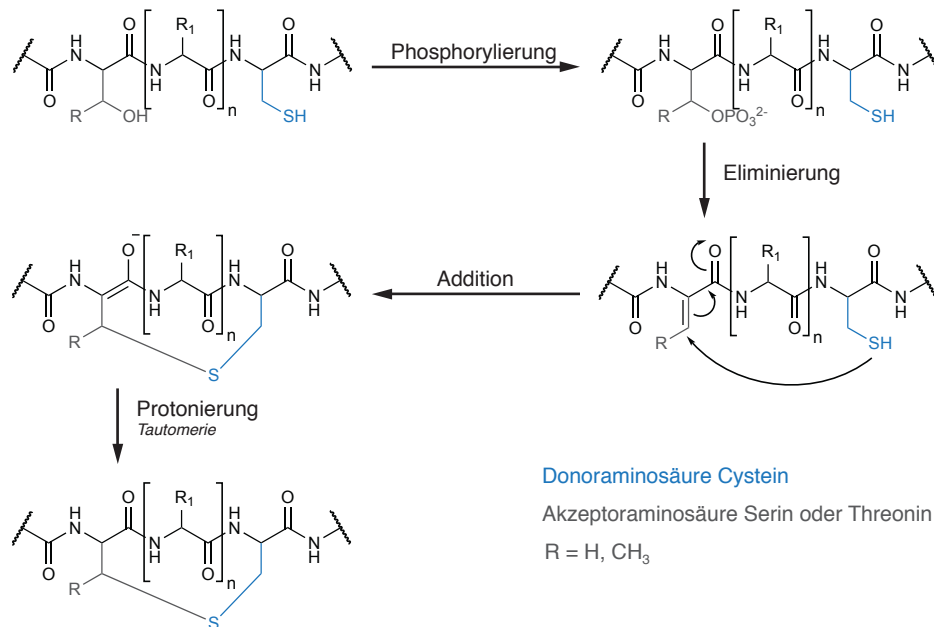


Abbildung 1.14: Mechanismus der Thioetherbrückenbildung in Lanthipeptiden. Zunächst wird die Hydroxylgruppe der Akzeptoraminosäure phosphoryliert, um eine gute Abgangsgruppe zu generieren. Anschließend findet eine Eliminierung zur dehydratisierten AS statt. Daraufhin kommt es in einer Michaelartigen Reaktion zur Ausbildung des Thioethers. Im letzten Reaktionsschritt wird das gebildete negativ geladene Intermediat protoniert und es bildet sich Lan bzw. MeLan.

Zur Zeit sind die Lanthipeptide in vier Unterklassen unterteilt (Knerr and van der Donk, 2012). Die Einteilung richtet sich nach der unterschiedlichen Organisation der Enzyme, die an der Biosynthese der Lan-, MeLan- bzw. Lab-Reste beteiligt sind (Abbildung 1.15). Zur Unterklasse I werden Lanthipeptide gezählt, die in ihrem Gencluster über Gene für eine eigenständige Dehydratase (LanB) (Karakas Sen et al., 1999; Kluskens et al., 2005; Koponen et al., 2002; Weil et al., 1990) und eine eigenständige Cyclase (LanC) verfügen (Helfrich et al., 2007; Li et al., 2006; Meyer et al., 1995). Es wird angenommen, dass die an der Biosynthese beteiligten Proteine einen Multienzymkomplex bilden (Siegers et al., 1996). Die Lanthipeptidunterklassen II, III und IV verfügen über bifunktionale Lanthioninsynthetasen, die sich untereinander in ihrem Aufbau unterscheiden (Goto et al., 2010; Müller et al., 2010; Siezen et al., 1996; Xie et al., 2004). Die Lanthioninsynthetase der Unterklasse II (LanM) setzt sich aus einer N-terminalen Dehydratisie-

rungsdomäne und einer C-terminalen LanC-ähnlichen Cyclasedomäne zusammen. Die Dehydratisierungsdomäne besitzt keinerlei Sequenzhomologie zu bekannten Enzymen. Die Lanthioninsynthetasen der Unterklasse III (LanKC) und IV (LanL) verfügen über eine identische N-terminale Lyasedomäne und eine identische zentrale Kinasedomäne (Goto et al., 2010; 2011). Beide Domänen sind für die Dehydratisierung der Akzeptoraminosäure verantwortlich. Der Unterschied zwischen Unterklasse III und IV liegt in der C-terminalen Cyclasedomäne (Kodani et al., 2004). So besitzt Unterklasse IV eine LanC-homologe Domäne, wohin gegen Unterklasse III über eine putative Cyclasedomäne verfügt. Lanthioninsynthetasen der Unterklasse III werden in Lanthipeptidgenclustern gefunden, in denen das Endprodukt über Labioningruppen verfügt, wie sie z. B. in Labyrinthopeptin A2 (Abbildung 1.16) vorkommen (Meindl et al., 2010). Generell besitzen die an der Lanthipeptidbiosynthese beteiligten Enzyme eine geringe Substratspezifität, so dass es möglich ist, nicht modifizierte Aminosäuren des Corepeptides gegen andere proteinogene wie auch nicht proteinogene Aminosäuren auszutauschen (Levengood et al., 2009). Vor kurzem konnte darüber hinaus für Lacticin 481 (Unterklasse II) und Nisin (Unterklasse I) gezeigt werden, dass das Leaderpeptid während der Thioethergenerierung nicht zwingend mit dem Corepeptid verknüpft sein muss (Levengood et al., 2007; Moll et al., 2010). Die Studien deuten darauf hin, dass die Funktion des Leaderpeptids eher in der Aktivierung der Synthetase liegt, als das Corepeptid korrekt in der Synthetase zu positionieren (Arnison et al., 2012; Oman et al., 2012).

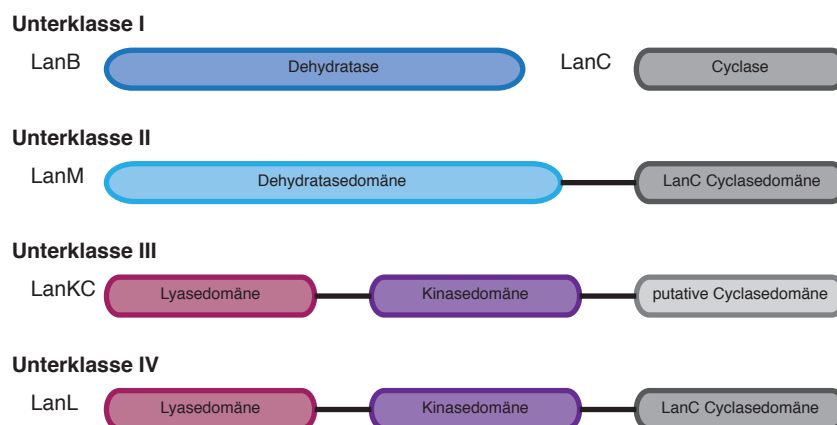
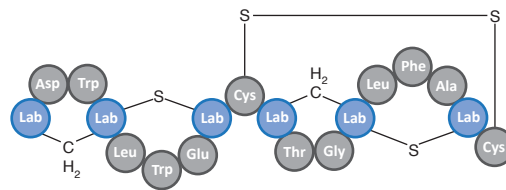


Abbildung 1.15: Überblick über die Lanthipeptideinteilung. Es wird zur Zeit zwischen vier Unterklassen unterschieden, die über die Organisation der für die Synthese der Lanthionin- bzw. Labionionreste verantwortlichen Enzyme unterschieden werden.



Labyrinthopeptin A2
Actinomadura sp.

Abbildung 1.16: Vereinfachte Struktur von Labyrinthopeptin A2. Die Labionengruppen sind blau hervorgehoben. Darüber hinaus verfügt das Peptid über eine Disulfidbrücke.

1.2.3 Thiopeptide

Bei Thiopeptiden handelt es sich um stark modifizierte makrozyklische RPs, dessen makrozyklischer Ring über einen für Thiopeptide charakteristischen stickstoffhaltigen 6-Ring verknüpft ist. Dieser 6-Ring kommt als Piperidin-, Dehydropiperidin- oder Pyridinrest in drei verschiedenen Oxidationsstufen vor (Bagley et al., 2005). Auf Grund des Oxidationszustandes des Rings und seines Substitutionsmusters werden Thiopeptide in fünf verschiedene Serien eingeteilt (Abbildung 1.17a) (Hensens and Albers-Schönberg, 1978). Das am längsten bekannte Mitglied der RP Klasse ist Micrococцин P₁ aus *Staphylococcus equorum* (Abbildung 1.17b), das mit einem Pyridinring der Serie d zuzuordnen ist und Ende der 1940er Jahre entdeckt wurde (SU, 1948). Wie andere Thiopeptide verfügt es zusätzlich zu dem stickstoffhaltigen 6-Ring über mehrere Thiazol- und Dehydrobutyrylgruppen. Darüber hinaus werden auch Dehydroalalinreste beobachtet (Bagley et al., 2005).

Zur Zeit besteht die Naturstoffklasse aus ungefähr 100 Mitgliedern, die hauptsächlich von Actinobakterien produziert werden (Bagley et al., 2005; Hensens and Albers-Schönberg, 1978). Die biologische Aktivität erstreckt sich zur Zeit nur auf wenige Anwendungsgebiete. So besitzt die Mehrheit der Thiopeptide antimikrobielle Eigenschaften gegen Gram-positive, nicht aber gegen Gram-negative Spezies, da diese wahrscheinlich nicht die äußere Zellmembran von Gram-negativen Bakterien durchdringen können (Anborgh and Parmeggiani, 1991; Mikolajka et al., 2011; Rodnina et al., 1999; Starosta et al., 2009). Haben die Peptide die Zellmembran durchdrungen inhibieren sie die ribosomale Proteinsynthese auf zwei verschiedene Weisen: Der Großteil der Thiopeptide ist in der Lage, an einer Stelle zwischen dem ribosomalen Protein L11 und der 23s rRNA zu binden und so die Bindung von Translationsfaktoren an das Ribosom zu verhindern (Lentzen et al., 2003; Porse et al., 1999; 1998). Eine Minderheit der Peptide bindet an den Elogationsfaktor Tu (EF-Tu). Dadurch ist dieser nicht mehr in der Lage, den EF-Tu-Aminoacyl-tRNA-Komplex auszubilden, der für den Transport der Aminosäuren an das Ribosom benötigt wird. Die beladenen tRNAs werden somit gehindert, das Ribosom zu erreichen (Anborgh and Parmeggiani, 1991; Heffron and Jurnak, 2000; Morris et al., 2009; Parmeggiani et al.,

2006). Ein weiterer Anwendungsbereich könnte in der Nutzung von Thiopeptiden als Malaria- und Krebsmedikament liegen. So konnte für Thiostrepton A eine antimalarialische und krebs-hemmende Wirkung festgestellt werden (Aminake et al., 2011; McConkey et al., 1997; Rogers et al., 1998; Schoof et al., 2010). Auf Grund der hohen Toleranz der Biosynthesemaschinerie gegenüber einem Aminosäureaustausch wäre es möglich, neue und spezifische Medikamente herzustellen.

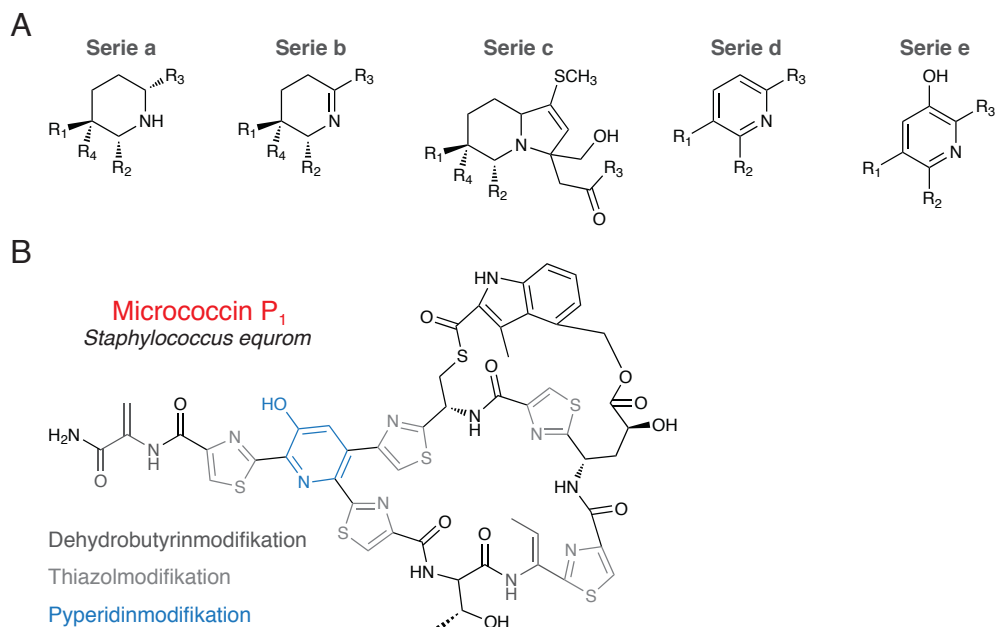


Abbildung 1.17: Strukturelle Besonderheiten von Thiopeptiden. (A) Das charakteristische Strukturmerkmal von Thiopeptiden ist ein Stickstoff-haltiger 6-Ring, der in drei Oxidationsstufen vorkommt. Zur Zeit werden die Thiopeptide in fünf verschiedene Serien (a – e) eingeteilt. (B) Struktur von Micrococcin P₁, dem ersten isolierten Thiopeptid. Der charakteristische 6-Ring ist blau hervorgehoben, andere posttranslationale Modifikationen grau.

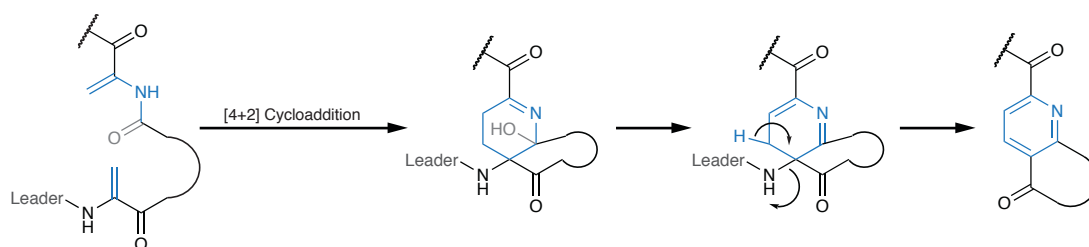


Abbildung 1.18: Von Bycroft et al. vorgeschlagener Mechanismus zur Generierung des für Thiopeptide charakteristischen Stickstoff-haltigen 6-Rings. Der erste Reaktionsschritt ist voraussichtlich eine [4+2] Cycloaddition, in der der 6-Ring gebildet wird. Anschließend finden Eliminierungen statt, bei denen unter anderem der Leader mit abgespalten werden kann. Die im 6-Ring integrierten Atome sind blau hervorgehoben.

Der ribosomale Ursprung der Naturstoffklasse wurde erst im Jahr 2009 durch die Identifizierung von fünf Genclustern, die für die Synthese von Thiopeptiden verantwortlich sind, erbracht (Kelly

et al., 2009; Liao et al., 2009; Morris et al., 2009; Wieland Brown et al., 2009). Auf Grund dieser Studien konnte ein Mechanismus zur Biosynthese erstellt werden (Ding et al., 2010; Engelhardt et al., 2010; Wang et al., 2010; Young and Walsh, 2011). Die Dha- bzw. Dhb-Gruppen werden aus Serin bzw. Threoninresten durch LanB homologe Dehydratasen erzeugt (Karakas Sen et al., 1999; Koponen et al., 2002). Die Synthese der Thiazolgruppen erfolgt auf ähnliche Weise wie bei Cyanobactinen (Kapitel 1.2.6) und linearen Azol(in)-enthaltenen Peptiden (LAPs) durch eine Cyclodehydratase und Dehydrogenase. Für die Synthese des für Thiopeptide charakteristischen Stickstoff-haltigen 6-Rings wird eine sequenzielle oder konzertierte [4+2] Cycloaddition vermutet (Abbildung 1.18) (Bycroft and Gowland, 1978). Wird die generierte Dehydropiperidin-Gruppe zusätzlich zu Pyridin aromatisiert, könnte das Leaderpeptid in der Reaktion mit abgespalten werden (Arnison et al., 2012).

1.2.3.1 Cyclothiazomycin

Cyclothiazomycin (Abbildung 1.19) (Aoki et al., 1991) ist mit seinem dreifach substituierten Pyridinring ein Thiopeptid der Serie d. Es besitzt zusätzlich zu den Thiazol-, Dehydrobutyrin- und Dehydroalaningruppen noch eine weitere Modifikation. Dabei handelt es sich um einen sactipeptidähnlichen Thioether, der ein Schwefelatom eines Cysteinrestes mit dem α -Kohlenstoffatom eines Alaninrestes verknüpft. Es wird vermutet, dass die Biosynthese des Thioethers über einen Lanthipeptid-ähnlichen Mechanismus verläuft, nur dass hier der α -Kohlenstoff eines Dehydroalaninrestes nukleophil angegriffen wird, anstelle des β -Kohlenstoffatoms (Wang et al., 2010).

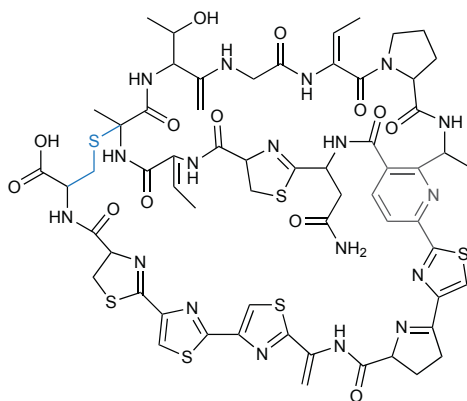


Abbildung 1.19: Struktur von Cyclothiazomycin. Der Pyridinring ist in grau, der sactipeptidähnliche Thioether in blau hervorgehoben.

1.2.4 Linaridine

Linaridine sind eine relativ neue Klasse von ribosomal produzierten Peptiden, die über einen den Lanthipeptiden ähnlichen Thioether verfügen, der aber über einen anderen biochemischen Mechanismus synthetisiert wird. Auf Grund dieser Tatsache wurde Cypemycin, das erste Mitglied dieser RP-Klasse (Abbildung 1.20a), zunächst auch den Lanthipeptiden zugeordnet (Minami et al., 1994). Analysen des Cypemycin-Genclusters ergaben aber, dass der terminale Aminovinylcysteinrest (AviCys, Abbildung 1.20b) nicht über die Addition eines Cysteins an das β -Kohlenstoffatoms eines Dha-Restes gebildet wird (Kempter et al., 1996), sondern über die Verknüpfung zweier Cysteingruppen (Claesen and Bibb, 2010). Ebenfalls wurden keine den Lanthipeptidsynthetasen homologe Biosynthesegene gefunden. Das Lanthipeptid Epidermin kann ebenfalls den Linaridinen zugeordnet werden, da es neben den Lan-Verknüpfungen über eine AviCys-Gruppe verfügt. Deshalb könnte es in Zukunft zu einer Reklassifizierung dieser Klasse kommen.

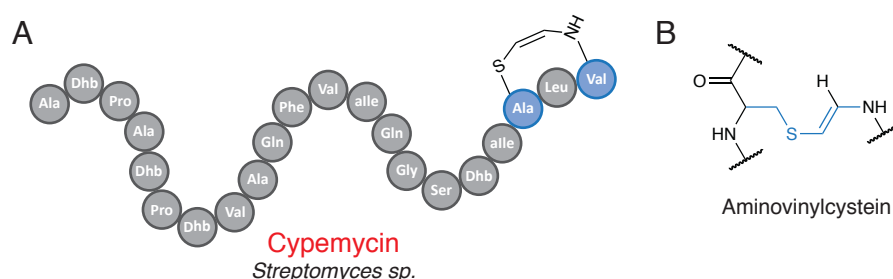


Abbildung 1.20: Überblick über die strukturellen Eigenschaften von Linaridinen. (A) Kugelmodell der Struktur von Cypemycin. (B) Charakteristisches Strukturmotiv von Linaridinen. Es handelt sich um eine Aminovinylcysteingruppe.

1.2.5 Proteusine

Zur ebenfalls relativ neuen Klasse der Proteusine gehören die 1994 aus dem Schwamm *Theonella swinhoei* isolierten Polytheonamide A und B (Abbildung 1.21a) (Hamada et al., 1994). Dabei handelt es sich um hochgradig modifizierte lineare Peptide, die aus jeweils 48 Aminosäuren und einem neuartigen N-terminalen Acylrest bestehen und neben der Abspaltung des Leaderpeptids über 48 weitere postranslationale Modifikationen verfügen (Hamada et al., 2005). Darunter befinden sich eine große Anzahl nicht proteinogener Aminosäuren, wie z. B. *tert*-Leucin, aber auch D-konfigurierte Aminosäuren. Darüber hinaus liegen die meisten Asparaginreste am Stickstoffatom der Amidgruppe methyliert vor. Diese Ergebnisse legten zunächst nahe, dass es sich bei den Polytheonamiden um nicht ribosomal synthetisierte Peptide handelt. In jüngeren Studien wurde aber der Beweis erbracht, dass es sich um ribosomal synthetisierte Peptide handelt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Peptide von einem bakteriellen Symbionten, der

unter anderem mit dem Schwamm *Theonella swinhoei* lebt, produziert werden. Im Polytheonamid-Gencluster (Abbildung 1.21b) wurden insgesamt sechs Gene gefunden, dessen Genprodukte voraussichtlich für die Generierung aller 48 posttranslationalen Modifikationen verantwortlich sind (Freeman et al., 2012).

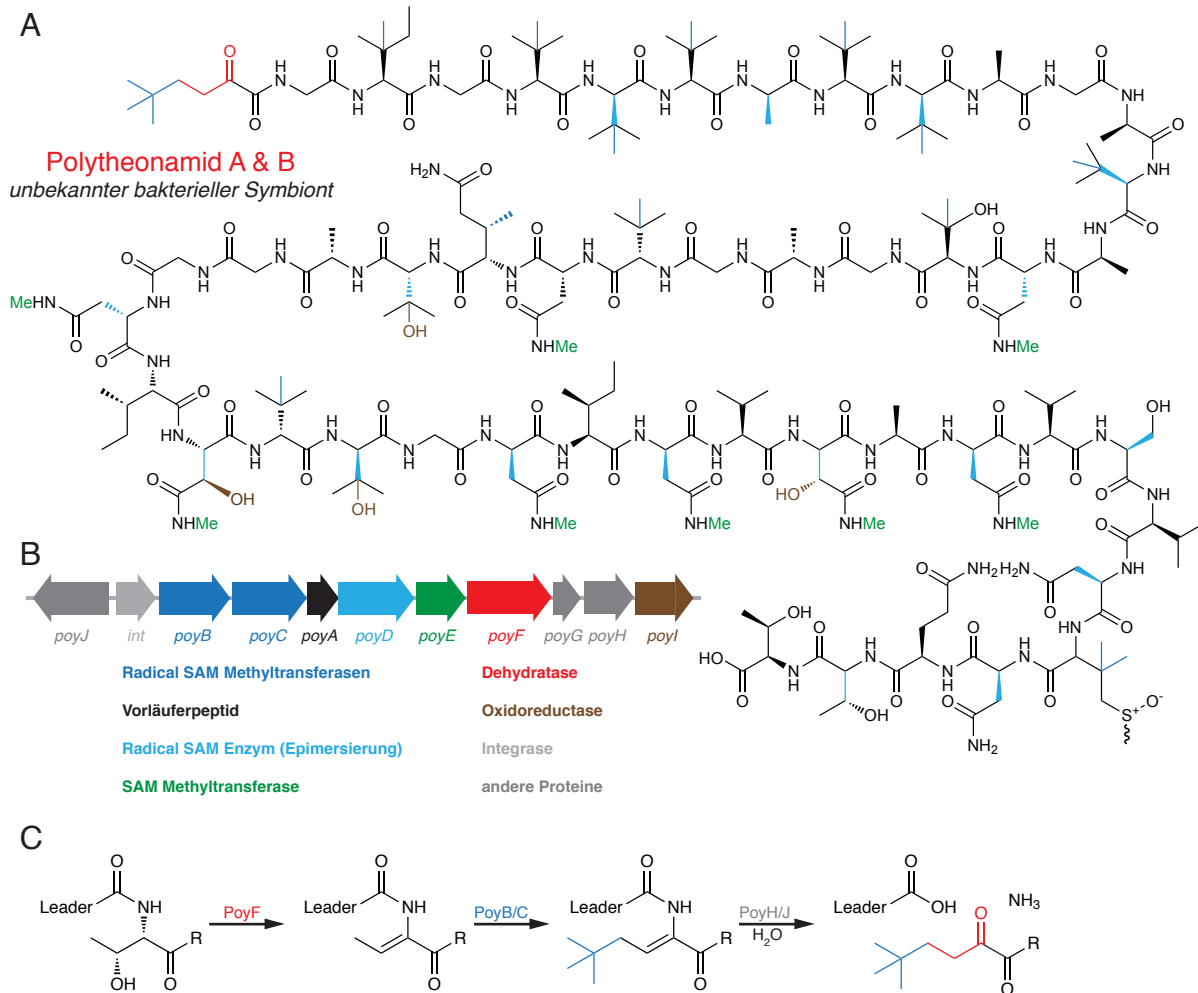


Abbildung 1.21: Überblick über wichtige Eigenschaften von Proteusinen. (A) Struktur von Polytheonamid A und B, einem Proteusin aus einem unbekannten bakteriellen Symbionten der auf dem Schwamm *Theonella swinhoei* vorkommt. Der Naturstoff besteht ursprünglich aus 49 Aminosäuren, die mit 48 posttranslationalen Modifikationen versehen sind. Diese sind farbig hervorgehoben. Während der Reinigung ist es zur Oxidation einer Methioningruppe gekommen, so dass zwei Verbindungen isoliert wurden. (B) Schematische Übersicht über den Gencluster, der für die Biosynthese von Polytheonamid benötigt wird. Die einzelnen Gene sind farblich passend zu den Modifikationen in (A) gekennzeichnet. Insgesamt wird die Einführung der beobachteten 48 Modifikationen von 6 Proteinen katalysiert. (C) Postulierte Biosynthese des N-terminalen Acylrestes, bei der voraussichtlich das Leaderpeptid mit abgespalten wird. An der katalysierten Reaktion sind wahrscheinlich drei Enzyme beteiligt.

Unter den codierten Proteinen befinden sich drei putative Radical SAM Enzyme. Die Funktionen der Genprodukte während der Biosynthese wurden teilweise durch *in vivo*-Studien etabliert. So konnte gezeigt werden, dass das Radical SAM Enzym PoyD für die Epimerisierung von 18 L-Aminosäuren in die D-konfigurierte Form verantwortlich ist. Die Grundlage des neuartigen N-

terminalen Acylrestes scheint ein Threoninrest zu sein, der zunächst durch das Enzym PoyF dehydratisiert wird (Abbildung 1.21c). Bei PoyF handelt es sich um eine putative Dehydratase, die eine hohe Homologie zur N-terminalen Dehydratasedomäne von Lanthioninsynthetasen der Unterklasse II (Abbildung 1.15, LanM) besitzt. Anschließend erfolgt die Übertragung einer *tert*-Butylgruppe auf das γ -Kohlenstoffatom des gebildeten Dhb-Restes. Diese Reaktion wird wahrscheinlich von den putativen Radical SAM Methyltransferasen PoyB oder PoyC katalysiert, die in der Lage wären, die *tert*-Butylgruppe sequentiell in Form von Methylgruppen zu transferieren. Durch anschließende Abspaltung des Leaderpeptids würde ein Enamin gebildet werden, dass in wasserreicher Umgebung zu einem Enol reagiert. Das gebildete Enol würde in die Ketoform umlagern und die in Abbildung 1.20a gezeigte Struktur bilden. Für die Methylierung und somit Generierung der nicht proteinogenen Aminosäuren sind aller Voraussicht nach auch die Radical SAM Enzyme PoyB und PoyC verantwortlich. Des Weiteren wird vermutet, dass für die Methylierung der meisten Arginingruppen die putative SAM Methyltransferase PoyE und für die Einführung von Hydroxylgruppen die putative Oxidoreduktase PoyI verantwortlich sind (Arnison et al., 2012; Freeman et al., 2012).

1.2.6 Cyanobactine

Zur Klasse der Cyanobactine gehören makrozyklische Peptide, die aus frei bzw. symbiotisch lebenden Cyanobakterien isoliert werden. Zusätzlich zur Makrozyklisierung des Peptidrückgrates verfügen sie über weitere posttranslationale Modifikationen, wie z. B. die Prenylierung von Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten, die Methylierung von Histidinresten und die Heterozyklisierung von Serin- bzw. Cysteingruppen zu Oxazol- bzw. Thiazolmodifikationen.

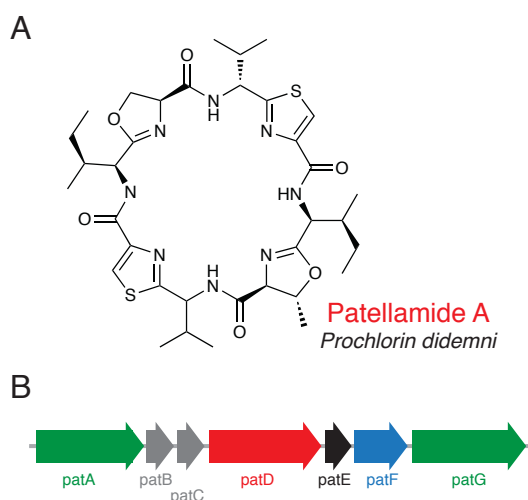


Abbildung 1.22: Übersicht über die Struktur von Patellamide A und den dazu gehörenden Gencluster. (A) Strukturformel von Patellamide A. Es verfügt über zwei Thiazol- und zwei Oxazolgruppen. (B) Organisation des *pat*-Operons, das für die Biosynthese von Patellamide A verantwortlich ist.

Aktuell sind über 200 Cyanobactine bekannt, die alle eine Größe zwischen 6 und 20 Aminosäuren besitzen (Arnison et al., 2012). Da sie über vielfältige Modifikationen verfügen, besitzen Cyanobactine eine breite biologische Aktivität. So wurden Vertreter mit antimikrobieller, antiviraler aber auch krebshemmender Wirkung gefunden. Das bekannteste und am besten untersuchte Mitglied der RP Klasse ist Patellamide A (Abbildung 1.22a), das 1982 aus der Seescheide *Lissoclinum patella* isoliert wurde (Donia and Schmidt, 2011; Koehnke et al., 2012; Schmidt et al., 2005). Im Jahr 2005 konnte durch Identifikation des zugehörigen Genclusters (Abbildung 1.22b) der eigentliche Produzent, das mit *Lissoclinum patella* symbiotisch lebende Cyanobakterium *Prochloron didemni*, bestimmt werden (Schmidt et al., 2005). Der Gencluster besteht aus insgesamt sieben Genen (*patA* bis *patG*). Der vorgeschlagene Biosynthesemechanismus ist in Abbildung 1.23a gezeigt.

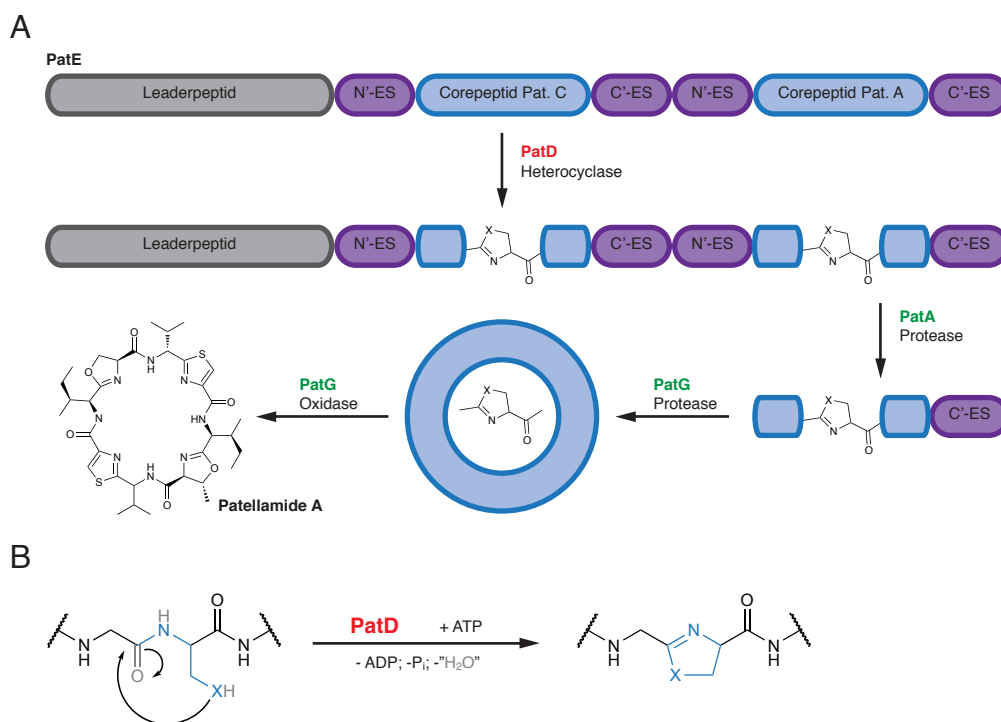


Abbildung 1.23: Postulierte Biosynthese von Patellamide A. (A) Übersicht über die postulierte Biosynthese von Patellamide A. Im ersten Biosyntheseschritt werden die Oxazol- bzw. Thiazolgruppen durch PatD eingefügt. Anschließend erfolgt die Abspaltung des Leaderpeptids durch die Protease PatA. Im dritten Reaktionsschritt wird das Peptidrückgrat durch PatG zykliert. Der finale Schritt der Biosynthese wird durch die Oxidasefunktion der Protease PatG katalysiert. (B) Mechanismus der Generierung der Oxazol- bzw. Thiazolfunktion durch PatD.

Das Gen *patE* codiert das Vorläuferpeptid, das aus einem Leaderpeptidbereich und zwei Corepeptiden (für Patellamide C und A) mit jeweils acht Aminosäuren besteht. Vor den Sequenzen der Corepeptide befindet sich zusätzlich jeweils eine Proteaseerkennungssequenz und nach den Sequenzen der Corepeptide jeweils eine N-terminale Erkennungssequenz mit einer

Länge von 4 bis 5 Aminosäuren. Im ersten Biosyntheseschritt werden die Dihydrothiazol- bzw. Dihydrooxazolringe aus Cys- bzw. Ser-/Thr-Gruppen unter Katalyse der Cyclodehydratase PatD gebildet. Der Mechanismus der ATP-abhängigen Dehydratisierung und anschließender Zyklisierung ist in Abbildung 1.23b gezeigt. Im zweiten Biosyntheseschritt entfernt die Protease PatA das Leaderpeptid mitsamt N-terminaler Proteaseerkennungssequenz. Anschließend schneidet die Protease PatG die C-terminale Erkennungssequenz ab und zyklisiert das Peptidrückgrat. PatG ist darüber hinaus auch für die Dehydrierung der Dihydrothiazol- bzw. Dihydrooxazolringe zu Thiazol- bzw. Oxazolringen verantwortlich. Das Enzym PatF hat in der Biosynthese von Patellamide A und C keine Funktion. In der Biosynthese von anderen Cyanobactinen sind homologe Proteine für die Prenylierung von Ser-, Thr- oder Tyr-Resten verantwortlich (Donia and Schmidt, 2011; Koehnke et al., 2012; McIntosh et al., 2009; 2011; 2010; Schmidt et al., 2005).

1.2.7 Pyrrolochinolinchinon (PQQ)

Pyrrolochinolinchinon (PQQ, Abbildung 1.24a) ist ein wichtiger Redoxcofaktor in einer Reihe bakterieller Dehydrogenasen, aber auch in der humanen Dopamin- β -Hydroxylase, die die Oxidation von Dopamin zu Noradrenalin katalysiert (Kasahara and Kato, 2003). Obwohl PQQ aus nur zwei Aminosäuren aufgebaut ist (Abbildung 1.24c), ist es von ribosomaler Herkunft, wie in Studien aus den späten 1980er und frühen 1990er Jahren gezeigt werden konnte (Goodwin and Anthony, 1998; Klinman, 2001; Puehringer et al., 2008).

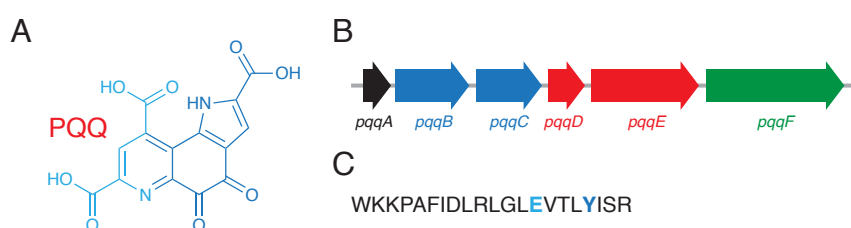


Abbildung 1.24: Übersicht über wichtige Informationen von Pyrrolochinolinchinon. (A) Strukturformel von PQQ. (B) Gencluster der für die Biosynthese von PQQ verantwortlich ist. Er verfügt über ein Radical SAM Enzym. (C) Aminosäuresequenz des PQQ Vorläuferpeptids PqqA. Es werden nur zwei der im Vorläuferpeptid vorkommenden Aminosäuren in PQQ eingebaut (blau hervorgehoben).

Der für die Biosynthese benötigte Gencluster setzt sich aus sechs Genen zusammen (Abbildung 1.24b). Das Gen *pqqA* codiert das 22 Aminosäuren lange Vorläuferpeptid. In das prozessierte PQQ werden davon zwei nicht benachbarte Aminosäuren, jeweils ein Glutamat und ein Tyrosin, eingebaut. Die Rekonstitution der Biosynthese war trotz starker Bemühungen bis jetzt nicht möglich. Bei PqqB handelt es sich um eine putative Oxygenase, dessen Funktion unbekannt ist. Für PqqC wurde gezeigt, dass es die finale Oxidation in einer Sauerstoff-abhängigen

Reaktion katalysiert. PqqD bildet mit dem Radical SAM Enzym PqqE einen Komplex. Es wird angenommen, dass dieser Komplex die Reihenfolge der Reaktionen steuert, da für PqqD angenommen wird, dass es in der Lage ist, das Vorläuferpeptid zu koordinieren. Das Radical SAM Enzym ist voraussichtlich für die Bildung einer C-C-Bindung verantwortlich. Bei PqqF handelt es sich um eine putative Zink-abhängige Protease. Hier wird angenommen, dass sie eine Rolle in der Spaltung des Peptidrückgrates spielt. Es wurde jedoch in genetischen Studien gezeigt, dass nur die Gene *pqqACDE* für die Biosynthese von PQQ zwingend benötigt werden.

1.2.8 Lasso peptide

Lasso peptide sind Peptide ribosomalen Ursprungs, die eine Länge von 16 bis 23 Aminosäuren besitzen. Ihr charakteristisches Feature ist ein acht bis neun Aminosäuren großer Makrolaktamring, der durch Zyklisierung der N-terminalen Aminogruppe mit einer Carboxylgruppe der Seitenkette eines Glutamat- oder Aspartatrestes entsteht (Maksimov et al., 2012). Durch den entstandenen Ring ist der C-terminale Teil des Peptids hindurchgefädelt, so dass eine verknotete sogenannte Lassostruktur entsteht (Abbildung 1.25a). Die Mehrzahl der Lasso peptide wird von Actinobakterien produziert. Sie sind zur Zeit in drei Klassen eingeteilt.

Die Einteilung richtet sich nach der Anzahl auftretender Disulfidbrücken. So verfügen Lasso peptide der Klasse 1 über zwei Disulfidbrücken mit einem N-terminalen Cysteinrest. Siamycin 1 (Lin et al., 1996; Yano et al., 1996) ist ein Vertreter dieser Klasse (Abbildung 1.25b). Lasso peptide der Klasse 2 besitzen keine Disulfidbrücken und verfügen über einen Glycinrest am N-Terminus. Diese Klasse hat aktuell die meisten Mitglieder, einschließlich der am Besten charakterisierten Peptide Microcin J25 (Delgado et al., 2001; Salomón and Farías, 1992) und Capistrin (Abbildung 1.25c&d) (Knappe et al., 2009; 2008; Kuznedelov et al., 2011). Lasso peptide der Klasse 3 besitzen eine Disulfidbrücke und einen N-terminalen Glycinrest. Zu Zeit ist nur ein Vertreter bekannt, das Peptid BI-32169 (Abbildung 1.25e) (Knappe et al., 2010).

Die spezielle Struktur der Lasso peptide wird im Folgenden am Beispiel von Microcin J25 erläutert: Microcin J25 ist ein von *E. coli* AY25 produziertes Lasso peptide. Es besitzt einen acht Aminosäuren großen N-terminalen Makrolaktamring, der durch Zyklisierung der Aminogruppe des N-terminalen Glycinrestes mit der Carboxylgruppe der Seitenkette von Glutamat 8 (Glu8) entsteht. Durch diesen Ring ist der aus 13 Aminosäuren bestehende C-terminale Schwanz hindurchgefädelt. Durch die platzraubenden aromatischen Aminosäuren Phe19 und Tyr20 bleibt er im Ring eingeklemmt. Das Peptid wird daher erst bei hohen Temperaturen entfädelt. Der Microcin J25 Gencluster besteht aus vier Genen *mcjA*, *mcjB*, *mcjC* und *mcjD*. Bei *McjA* handelt es sich um das Vorläuferpeptid und bei *McjD* um einen membranständigen ABC-Transporter. Die eigentliche Biosynthese des Lasso peptides wird von den beiden Proteinen *McjB* und *McjC*

durchgeführt. Bei McjB handelt es sich um eine putative ATP-abhängige Cystein Protease, die voraussichtlich für die Abtrennung des Leaderpeptids verantwortlich ist. McjC besitzt Homologie zur Asparagin-Synthetase B und ist daher vermutlich für die Synthese der Isopeptidbindung zwischen Gly1 und Glu8 verantwortlich. In einer vor kurzem veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass McjB und McjC tatsächlich die Synthese der Lassostruktur katalysieren. Darüber wurde gezeigt, dass die Reaktion ATP-abhängig ist und beide Enzyme nur in einem McjB-McjC-Komplex aktiv sind (Pan et al., 2012; Yan et al., 2012).

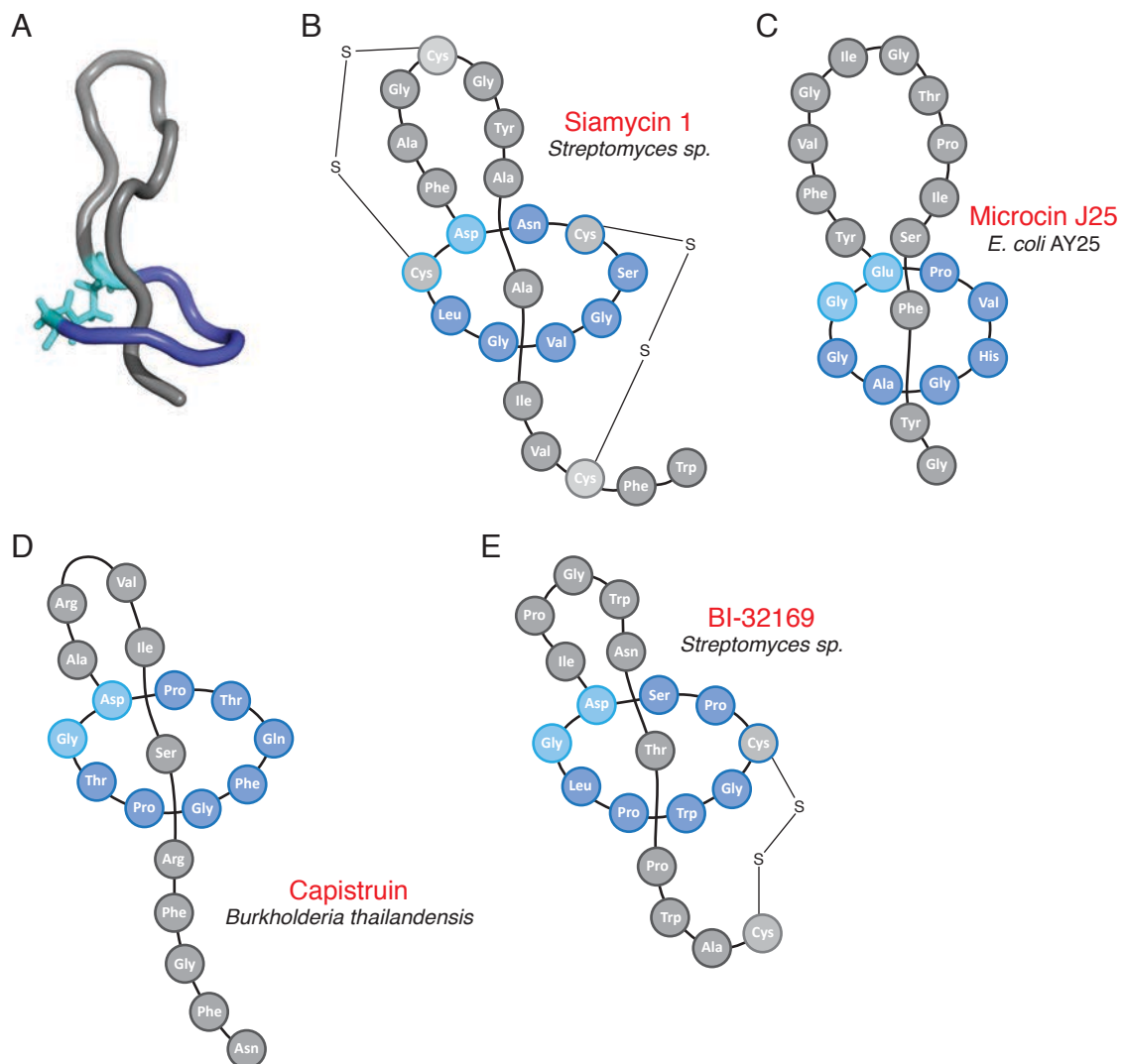


Abbildung 1.25: Übersicht über die Strukturen mehrerer Lasso peptide. (A) NMR-Struktur von Microcin J25. (B) Kugelmodell der Struktur von Siamycin 1, einem Lasso peptide der Klasse 1. (C) Kugelmodell der Struktur von Microcin J25, einem Lasso peptide der Klasse 2. (D) Kugelmodell der Struktur von Capistruin, ebenfalls einem Lasso peptide der Klasse 2. (E) Kugelmodell der Struktur von BI-32169, einem Lasso peptide der Klasse 3.

Die Bioaktivität von Lasso peptiden ist zur Zeit noch auf wenige Bereiche beschränkt. So zeigen viele Vertreter der Klasse antimikrobielle Eigenschaften gegen Gram-negative und Gram-

positive Bakterien. Auch konnte gezeigt werden, dass Klasse 1 Lassos wie Siamycin 1, Si-
amycin 2 und RP-71995 eine HIV-bekämpfende Wirkung besitzen (Helynck et al., 1993; Lin et
al., 1996). Der vielversprechendste Ansatz wurde von *Knappe et al.* veröffentlicht (Knappe et
al., 2011). In ihrer Studie wurde eine Microcin J25-Variante generiert, die ein RGD-Motiv in der
oberen Loopstruktur besitzt. Das RGD-Motiv ist die Erkennungssequenz für eine Wechselwir-
kung mit den Integrinen avb3 und avb5. Dadurch wird dessen Aktivität reduziert und Wachstum
von Blutgefäßen stark verlangsamt. Das RGD-Motiv kommt z. B. im Medikament Cilengitide,
einem zyklischen Pentapeptid mit der Sequenz RGDFV, vor. Cilengitide wird zur Zeit für den
Einsatz gegen eine Reihe bösartiger Karzinome, besonders Glioblastome, getestet. Für die ge-
nerierte RGD-Microcin J25-Variante konnte *in vitro* eine erhöhte Selektivität für die Integrine
avb3 und avb5 gezeigt werden. Auch ist es in der Lage das Wachstum von Gefäßzellen *in vivo*
zu stoppen. Dieser Ansatz etablierte Lasso peptide als Arbeitsgrundlage zur Entwicklung neuar-
tiger Pharmakologika.

1.3 Radical SAM Enzyme

Das charakteristische Merkmal von Radical SAM Enzymen, ist die reduktive Spaltung von S-
Adenosylmethionin (SAM) in ein kohlenstoffzentriertes Radikal und ein weiteres Molekül. In fast
allen bis jetzt charakterisierten Enzymen wird Methionin und das 5'-Deoxyadenosylradikal (5'-
dA-Radikal) generiert (Abbildung 1.26) (Frey et al., 2008). Das erzeugte 5'-dA-Radikal wird in
einem zweiten Reaktionsschritt verwendet, um eine ganze Reihe ungewöhnlicher Transformati-
onen zu katalysieren. Darunter enthalten ist z. B. die Erzeugung des zentralen Kohlenstoffzent-
rums mit Carbidcharakter im Eisen-Molybdän-Cofaktor von Nitrogenasen (Wiig et al., 2012).

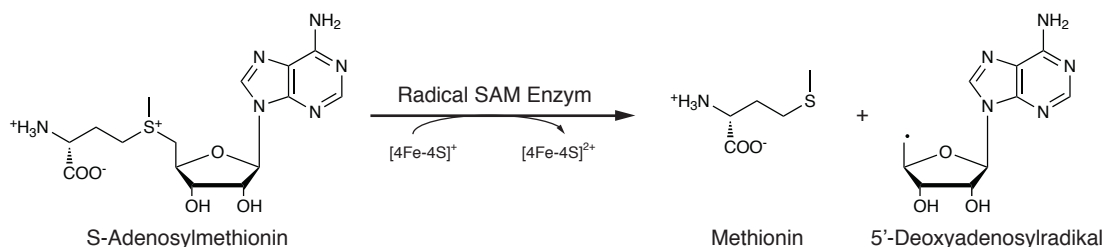


Abbildung 1.26: Übersicht über die von den meisten Radical SAM Enzymen katalysierte reduktive Spaltung von SAM in Methionin und das 5'-Deoxyadenosylradikal. Um die Reaktion durchführen zu können, benötigt das Radical SAM Enzym einen reduzierten [4Fe-4S]-Cluster.

Die Superfamilie der Radical SAM Enzyme wurde durch bioinformatische Studien von *Sofia et al.* im Jahr 2001 identifiziert (Sofia et al., 2001). Zu diesem Zeitpunkt konnten der Klasse 600 Enzyme zugeordnet werden. Im Jahr 2008 waren es schon 2800 Vertreter (Frey et al., 2008).

Heutzutage sind genetische Informationen zu mehr als 46000 putativen Radical SAM Enzymen in der NCBI-Datenbank gespeichert. Kurz nach Entdeckung der neuen Superfamilie wurden Radical SAM Enzyme noch als Vitamin B12 abhängige Enzyme des armen Mannes („*poor man's Vitamin B12*“) bezeichnet, da sie, wie auch die Adenosylcobalamin abhängigen Enzyme, ein 5'-dA-Radikal generieren und der SAM-Cofaktor im Verhältnis zum sehr komplexen Cobalamin sehr einfach aufgebaut ist (Frey, 1993). Auch schien die Enzymklasse nicht sehr verbreitet. Heutzutage müssen diese Aussagen zurückgenommen werden. Die Radical SAM Enzyme haben sich zu einer großen und diversen Klasse entwickelt, die in der Lage ist, weit mehr Transformationen durchzuführen als die Klasse der Adenosylcobalamin abhängigen Enzyme. Es wird davon ausgegangen, dass die Radical SAM Enzyme die evolutionären Vorläufer dieser Klasse sind (Frey et al., 2008).

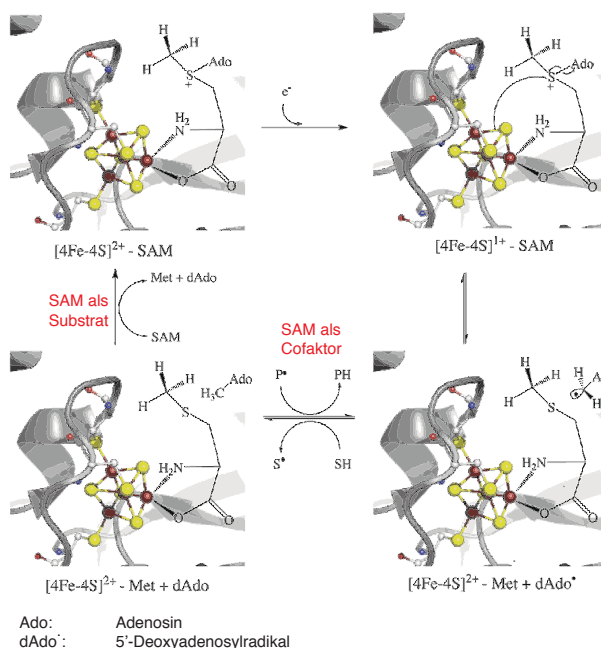


Abbildung 1.27: Genauer Ablauf der reduktiven SAM-Spaltung. Zunächst koordiniert SAM über die Amino- und Carboxyfunktion an das einzigartige Eisenatom des [4Fe-4S]-Clusters. Im zweiten Reaktionsschritt wird ein Elektron des reduzierten [4Fe-4S] auf das Sulfonium-Ion übertragen. Dadurch wird die Spaltung in Met und das 5'-dA-Radikal initiiert. Das generierte 5'-dA-Radikal wird in der Folgereaktion in katalytischen oder stöchiometrischen Mengen eingesetzt (Duschene et al., 2009).

Die reduktive Generierung des, für die jeweilige katalysierte Reaktion benötigten, 5'-dA-Radikals aus SAM wurde intensiv untersucht. Die Reaktion läuft an einem [4Fe-4S]-Cluster (Cofaktor) ab. Dieser ist über drei Cysteine koordiniert, die meistens in einem konservierten CXXXCXXC-Motiv vorkommen. Das konservierte CXXXCXXC-Motiv ist für Radical SAM Enzyme charakteristisch und befindet sich meistens in der N-terminalen Region des Enzyms. Die bioinformatische Klassifizierung als Radical SAM Enzym erfolgt über diese cysteinreiche Region. Drei der vier Eisen-

atome des [4Fe-4S]-Cofaktors sind über die Thiofunktionen der drei Cysteingruppen koordiniert. Das vierte Eisenzentrum des Clusters besitzt demnach eine freie Koordinationsstelle und wird daher auch als einzigartiges („*unique*“) Eisen bezeichnet. Dieses einzigartige Eisenatom ist in der Lage, SAM über dessen Carboxy- und Aminogruppe zu koordinieren (Abbildung 1.27).

Zur Spaltung des gebundenen S-Adenosylmethionins wird im ersten Reaktionsschritt der [4Fe-4S]-Cluster durch ein externes ein-Elektronen-Reduktionsmittel vom [4Fe-4S]²⁺-Zustand in den [4Fe-4S]⁺-Zustand reduziert. Der reduzierte Fe/S-Cluster ist nun in der Lage ein Elektron auf die Sulfoniumgruppe des SAM-Liganden zu transferieren (Henshaw et al., 2000). Als Folge der Reduktion spaltet sich SAM in Methionin und das 5'-dA-Radikal. In einigen Radical SAM Enzymen wurde beobachtet, dass der Komplex aus [4Fe-4S]⁺-Cluster und SAM bei Abwesenheit des zweiten Substrates relativ stabil ist und somit eine frühzeitige Erzeugung des hochreaktiven 5'-dA-Radikals verhindert wird. Das am [4Fe-4S]-Cluster generierte 5'-dA-Radikal ist für die Katalyse der weiteren Reaktionsschritte verantwortlich. Es wird dabei entweder katalytisch als Cofaktor eingesetzt oder in stöchiometrischen Mengen als weiteres Substrat verwendet. Im Fall, dass es in katalytischen Mengen eingesetzt wird, wird das Radikal im letzten Reaktionsschritt regeneriert (Duschene et al., 2009). Ein Beispiel hierfür ist die Lysin-2,3-Aminomutase (Kapitel 1.3.1).

Als externes Reduktionssystem für die Aktivierung des oxidierten [4Fe-4S]²⁺-Cluster kommt *in vivo* das Flavodoxin-abhängige Redoxsystem zum Einsatz (Abbildung 1.28). Dazu wird zunächst oxidiertes Flavodoxin durch eine NAD(P)H-abhängige Flavodoxinreduktase in reduziertes Flavodoxin überführt, was in der Lage ist, den im Radical SAM Enzym gebundenen [4Fe-4S]-Cluster zu reduzieren. Das dabei gebildete oxidierte Flavodoxin geht erneut in den Kreislauf ein (Layer et al., 2005; Mulliez et al., 2001). *In vitro* wird als Reduktionsmittel meistens Natriumdithionit eingesetzt (Lee et al., 2009b).

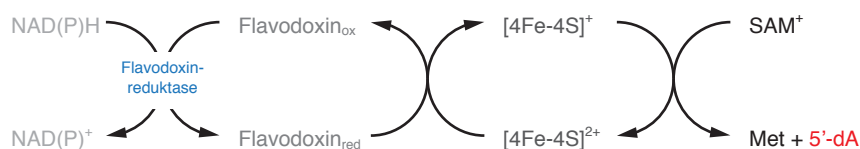


Abbildung 1.28: *In vivo*-Reduktionssystem für die Erzeugung aktiver Radical SAM Enzyme. Zunächst wird Flavodoxin durch eine NAD(P)H-abhängige Flavodoxinreduktase reduziert. Dieses ist in der Lage, ein Elektron auf einen nicht reduzierten [4Fe-4S]-Cluster zu übertragen.

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden die Strukturen von insgesamt 14 Radical SAM Enzymen durch röntgenspektroskopische Charakterisierung der jeweiligen Enzymkristalle bestimmt (Atta

et al., 2010; Benjdia et al., 2012; Boal et al., 2011; Forouhar et al., 2013; Zhang et al., 2010). Alle bisher bekannten Mitglieder besitzen eine vollständige oder partielle sogenannte *TIM-barell*-Faltung. Darunter wird eine Struktur verstanden, die maximal aus acht abwechselnden α -Helices und β -Faltblättern besteht. Die β -Faltblätter bilden eine Fassstruktur aus, die das Zentrum des jeweiligen Enzyms bilden. Der über das CXXXCXXC-Motiv koordinierte [4Fe-4S]-Cluster befindet sich gut abgeschirmt von der Umgebung im Zentrum dieser Fassstruktur. In Abbildung 1.29 ist stellvertretend die Struktur der Lysin-2,3-Aminomutase gezeigt (Lepore et al., 2005). Es ist zu erkennen, dass das einzigartige Eisenatom des [4Fe-4S]-Clusters zum Zentrum des Strukturmotivs ausgerichtet ist, um SAM abgeschirmt von jeglichen Wassermolekülen zu koordinieren. Dadurch wird verhindert, dass das während der Reaktion gebildete 5'-dA-Radikal unkontrolliert mit anderen Komponenten der Lösung reagiert. Aus der Struktur geht darüber hinaus hervor, dass SAM über weitere Reste des Proteins in der Bindungsstelle fixiert wird. So wird eine exakte Koordination von SAM und besonders dem gebildeten 5'-dA-Radikal ermöglicht, damit das hochreaktive Radikal ausschließlich mit dem ebenfalls gebundenen Substrat reagieren kann (Atta et al., 2010; Duschene et al., 2009). Im Folgenden werden die Lysin-2,3-Aminomutase wie auch alle bekannten Radical SAM Enzyme, die mehr als einen [4Fe-4S]-Cluster koordinieren vorgestellt.

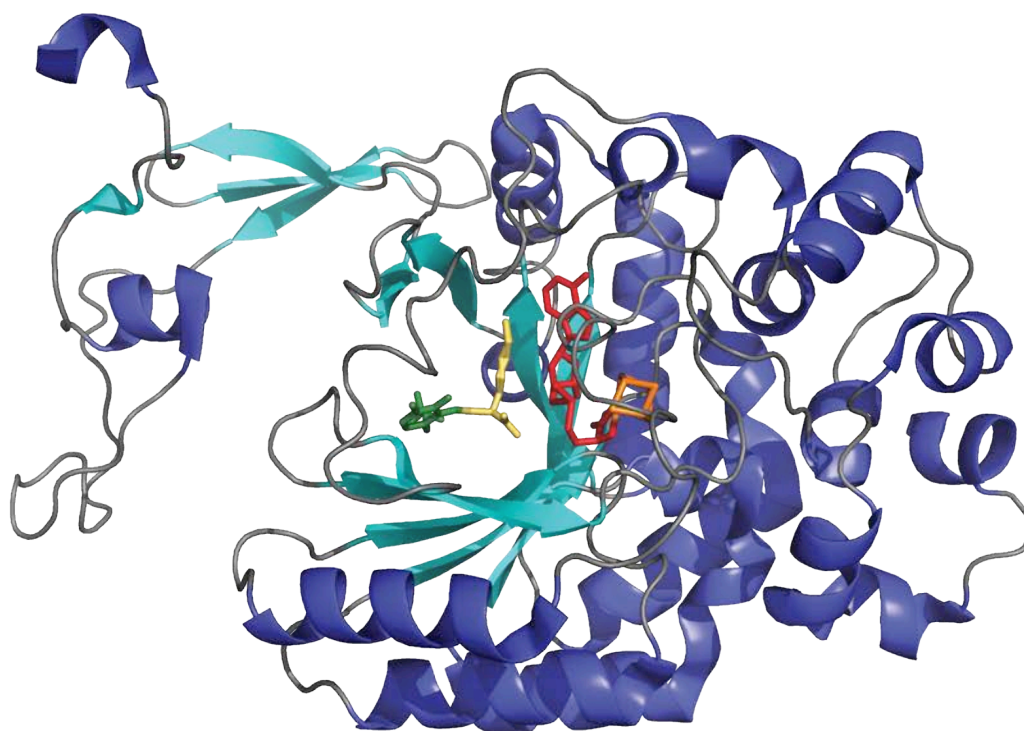


Abbildung 1.29: Struktur der Lysin-2,3-Aminomutase. Das aus acht β -Faltblättern bestehende *TIM-barell* ist in cyan dargestellt. Das aktive Zentrum des Enzym, in dem PLP (grün), Lysin (gelb), SAM (rot) und der [4Fe-4S]-Cluster (orange) koordiniert sind, liegt in diesem Strukturmotiv.

1.3.1 Lysin-2,3-Aminomutase

Die Lysin-2,3-Aminomutase (LAM) ist das am Längsten bekannte (Chirpich et al., 1970) und auch eins der am Besten charakterisierten Radical SAM Enzyme (Frey et al., 2008). Es katalysiert die Transformation von Lysin zu β -Lysin (Abbildung 1.30a), also die Umlagerung der Aminogruppe vom α -Kohlenstoffatom zum β -Kohlenstoffatom über einen radikalischen Mechanismus. Es ist darüber hinaus eins der wenigen Enzyme, die SAM in katalytischen Mengen einsetzt. Als zusätzlicher Cofaktor wird von LAM noch Pyridoxalphosphat (PLP) benötigt. Der genaue Mechanismus ist in Abbildung 1.30b gezeigt.

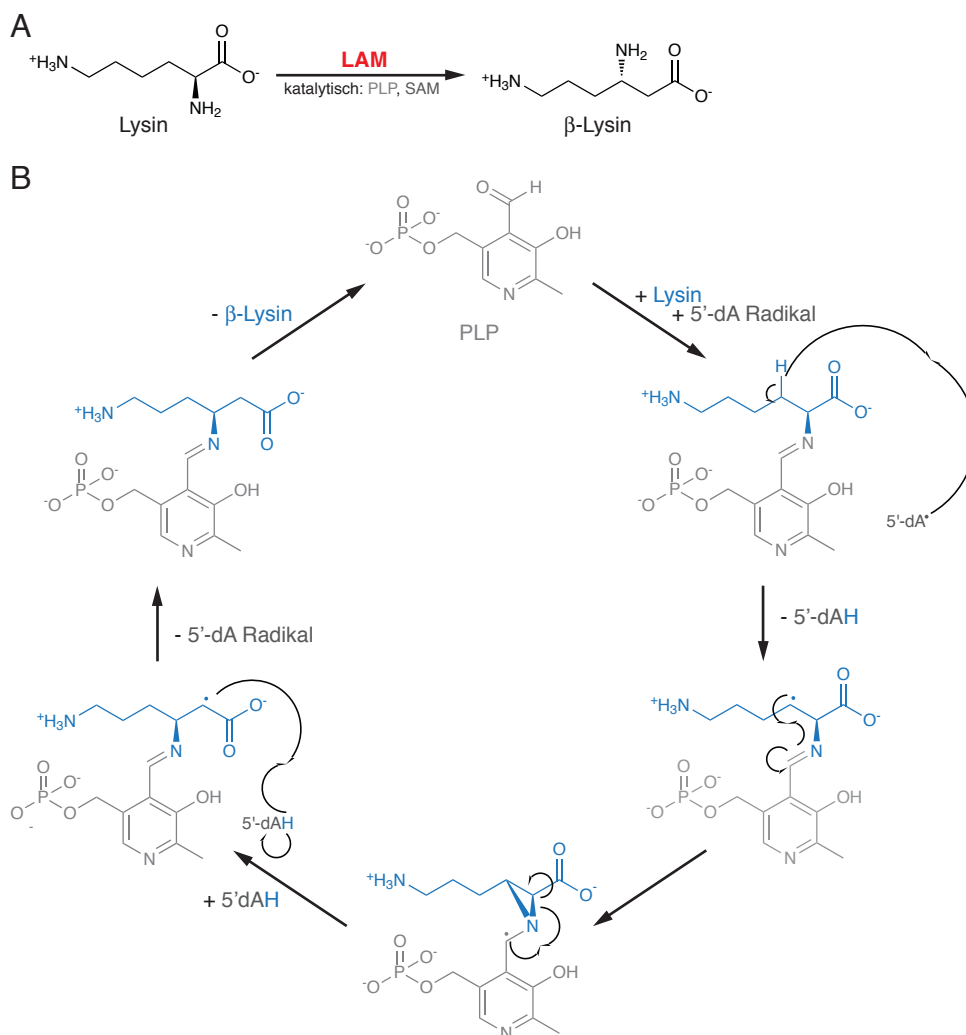


Abbildung 1.30: Übersicht über die von der Lysin-2,3-Aminomutase katalysierten Reaktion. (A) Reaktionsgleichung der von LAM katalysierten Umlagerung von Lysin in β -Lysin. (B) Genauer Reaktionsmechanismus der in (A) beschriebenen Reaktion.

Im ersten Reaktionsschritt wird Lysin kovalent unter Ausbildung eines Imins an das im aktiven Zentrum des Enzyms lokalisierte PLP gebunden. Im zweiten Reaktionsschritt wird reduktiv das

5'-dA-Radikal aus SAM generiert. Dieses ist in der Lage ein Wasserstoffatom des β -Kohlenstoffs von Lysin zu abstrahieren. Das neu gebildete kohlenstoffzentrierte Radikal wird unter Bildung eines Aziridinylradikals durch PLP stabilisiert. Das Aziridinylradikal steht im Gleichgewicht mit den offenkettigen kohlenstoffzentrierten Radikalen, so dass es zu einer Migration der Aminfunktion um ein Kohlenstoffatom am gebundenen Lysin kommen kann. Das dabei gebildete α -kohlenstoffzentrierte Radikal reagiert im letzten Reaktionsschritt unter Regenerierung des 5'-dA-Radikals mit 5'-Deoxyadenosin. Durch Abspaltung der an PLP gebundenen Aminosäure wird β -Lysin erhalten.

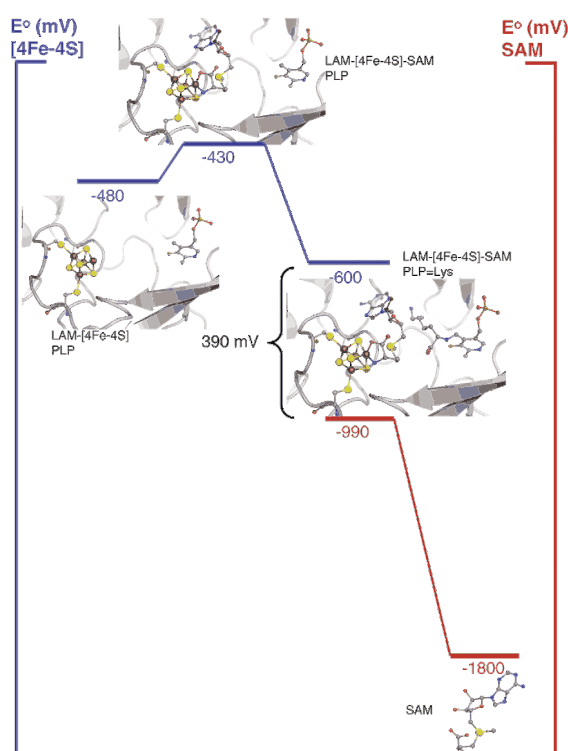


Abbildung 1.31: Diagramm der Potentiale von freiem SAM und freiem [4Fe-4S]-Cluster und den jeweiligen in LAM gebundenen aktivierten Varianten. Die Potentialdifferenz wird durch Bindung im Radical SAM Enzym auf - 390 mV reduziert (Duschene et al., 2009).

Für die reduktive Spaltung von SAM in freier Lösung zu Methionin und das 5'-dA-Radikal werden Reduktionsmittel mit einem Potential von maximal -1.8 V benötigt. Die in Radical SAM Enzymen aktivierte reduzierte Form des $[4Fe-4S]^+$ -Clusters besitzt ein Potential von -430 mV und sollte demnach nicht in der Lage sein, SAM reduktiv zu spalten. Detaillierte Studien an LAM konnten zeigen, wie es Radical SAM Enzymen doch möglich ist, die Spaltungsreaktion zu katalysieren und die Potentialdifferenz von ca. 1.4 V, was einer Energiebarriere von ca. 32 kcal/mol entspricht, zu überbrücken (Abbildung 1.31). Durch Koordination von SAM an das einzigartige

Eisenatom des [4Fe-4S]-Clusters wird das Potential, was zur Spaltung von SAM benötigt wird, auf -990 mV erhöht. Dadurch wird die Energiebarriere um 19 kcal/mol auf 13 kcal/mol herabgesetzt. Zusätzlich dazu wird durch Bildung des Komplexes aus SAM, PLP und Lysin das Potential des [4Fe-4S]⁺-Clusters auf -600 mV herabgesetzt, was einer Reduktion der Potentialdifferenz von weiteren 170 mV entspricht. Die Energiebarriere beträgt jetzt nur noch ca. 9 kcal/mol. Die reduktive SAM-Spaltung ist damit möglich (Duschene et al., 2009; Hinckley and Frey, 2006; Wang and Frey, 2007).

1.3.2 Biotin-Synthase

Die Biotin-Synthase (BioB) katalysiert mit der Umwandlung von Dethiobiotin in Biotin den letzten Reaktionsschritt der Biotinbiosynthese (Abbildung 1.32a) in z. B. *Escherichia coli*. Es ist das am Besten charakterisierte Radical SAM Enzym, das für die Insertion eines Schwefelatoms in ein Substrat verantwortlich ist. Durch aufwendige UV-Vis, EPR- und weitere spektroskopische Studien, wie auch durch die Ermittlung der Struktur mittels Kristallstrukturanalyse, wurde gezeigt, dass BioB neben dem für Radical SAM Enzyme typischen [4Fe-4S]-Cluster einen weiteren [2Fe-2S]-Cluster bindet (Cosper et al., 2002; Jameson et al., 2004; Ugulava et al., 2001a; 2001b). Dieser ist durch drei Cysteingruppen, die in einem CX₃CX₂C-Motiv angeordnet sind, und einen konservierten Argininrest koordiniert.

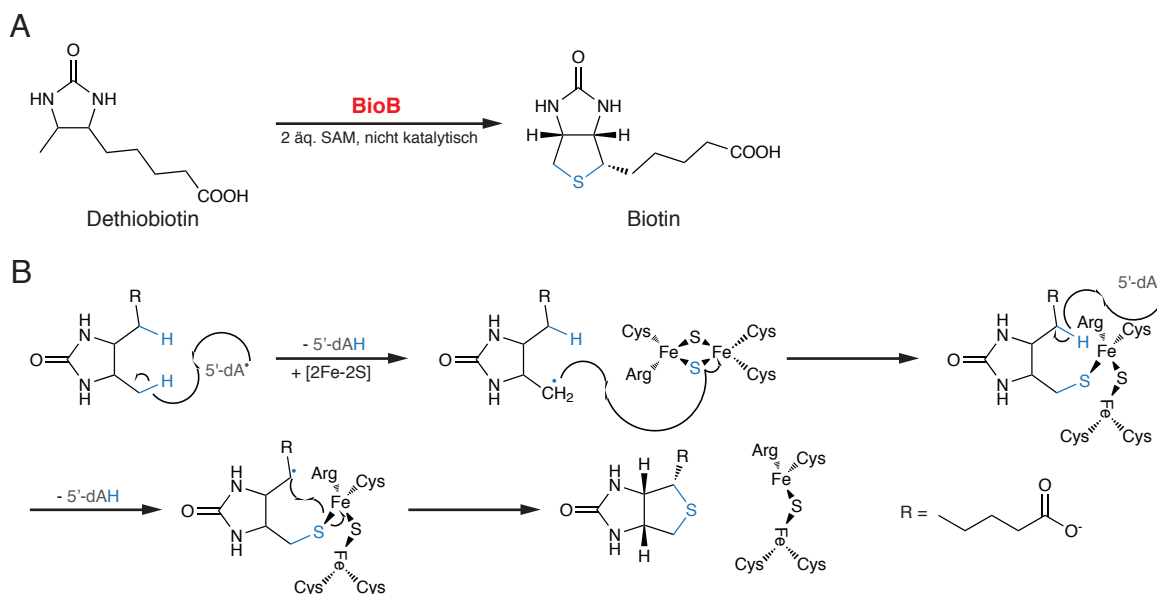


Abbildung 1.32: Überblick über die von BioB katalysierte Reaktion. (A) Reaktionsgleichung der von BioB katalysierten Umsetzung von Dethiobiotin in Biotin. Für die Reaktion werden zwei Äquivalente SAM benötigt. (B) Reaktionsmechanismus der in (A) gezeigten Reaktion. Der zweite in BioB gebundene Fe/S-Cluster wird bei der Synthese von Biotin degradiert, daher ist BioB nur in der Lage einen Turnover zu katalysieren.

Es wurde gezeigt, dass dieser zweite Fe/S-Cluster für die Biosynthese von Biotin zwingend erforderlich ist, da BioB-Mutanten innerhalb des CX₃CX₂C-Motivs nicht mehr in der Lage waren, die Insertion des Schwefelatoms in Dethiobiotin zu katalysieren. Weitere Studien zeigten, dass der [2Fe-2S]-Cluster während der Synthese von Biotin zu einem [2Fe-1S]-Cluster degradiert und dass der dabei freigesetzte Schwefel in Dethiobiotin eingebaut wird (Tse Sum Bui et al., 2006). Der [2Fe-2S]-Cluster agiert in der Reaktion als Schwefeldonor. *In vitro* wird das Enzym dabei irreparabel beschädigt. Es ist daher nur in der Lage, einen Turnover zu katalysieren. Der genaue Reaktionsmechanismus von BioB ist in Abbildung 1.32b gezeigt. Zuerst wird durch das generierte 5'-dA-Radikal ein Wasserstoffatom des C9-Kohlenstoffs von Dethiobiotin abstrahiert und das entsprechende kohlenstoffzentrierte Radikal gebildet. Dieses ist in der Lage, ein Schwefelatom des [2Fe-2S]-Clusters anzugreifen und eine Bindung mit diesem auszubilden. Im nächsten Reaktionsschritt wird erneut ein 5'-dA-Radikal erzeugt, dass diesmal das Wasserstoffatom des C6-Kohlenstoffs abstrahiert. Das dabei generierte Radikal greift ebenfalls den Schwefel des [2Fe-2S]-Clusters unter Bildung von Biotin an. Der [2Fe-2S]-Cluster wird zu einem [2Fe-1S] degradiert (Berkovitch, 2004; Fugate et al., 2012; Taylor et al., 2011).

1.3.3 Lipoyl-Synthase

Die Lipoyl-Synthase (LipA) katalysiert die Insertion zweier Schwefelatome in eine Octanylseitenkette des Lipoyl-Carrier-Proteins (LCP) unter Bildung des Lipoyl-Cofaktors (Cicchillo and Booker, 2005; Douglas et al., 2006; Miller et al., 2000; Zhao et al., 2003). Als Lipoyl-Cofaktor wird an LCP gebundene Liponsäure verstanden (Abbildung 1.33a). Die Reaktion ist ähnlich des von BioB katalysierten Schwefeleinbaus. Durch EPR- und Mössbauer-Spektroskopie wurde gezeigt, dass LipA neben dem für die SAM-Spaltung benötigten [4Fe-4S]-Cluster einen weiteren [4Fe-4S]-Cluster bindet. Dieser ist durch drei Cysteinreste eines konservierten CX₄CX₅C-Motivs koordiniert (Cicchillo et al., 2004b). Der zweite Fe/S-Cluster ist, wie in BioB, essentiell für die Biosynthese des Lipoyl-Cofaktors, wie durch Alaninscans des Bindungsmotivs gezeigt werden konnte. Durch weitere Studien wurde darüber hinaus festgestellt, dass die beiden in die Octanylseitenkette eingebauten Schwefelatome aus dem zweiten [4Fe-4S]-Cluster eines Enzyms stammen. Der Cluster dient somit als Schwefeldonor. Da LipA *in vitro* maximal ein Äquivalent LCP umsetzen kann, wird ebenfalls angenommen, dass der zweite [4Fe-4S]-Cluster während der Reaktion zerstört wird. Auf Grund dieser und weiterer Ergebnisse wurde ein Mechanismus der Biosynthese postuliert (Abbildung 1.33b).

Zuerst erzeugt das Radical SAM Enzym LipA ein 5'-dA-Radikal, das im zweiten Reaktionsschritt ein Wasserstoff des C6-Kohlenstoffs der Octanylseitenkette abstrahiert. Das neu generierte kohlenstoffzentrierte Radikal greift nun ein Schwefelatom des zweiten [4Fe-4S]-Clusters an. Die Reaktionsabfolge findet erneut für die C8-Position der Octanylseitenkette statt. Das dort erzeugte

Radikal greift im Gegensatz zu BioB ein anderes Schwefelatom des zweiten Fe/S-Clusters an. Im letzten Reaktionsschritt werden die beiden Thiolatgruppen protoniert und es bildet sich der Lipoyl-Cofaktor. In LipA bleibt ein degradiertes [4Fe-2S]-Cluster zurück. Das Enzym ist nicht mehr in der Lage einen weiteren Reaktionszyklus zu katalysieren (Cicchillo et al., 2004a).

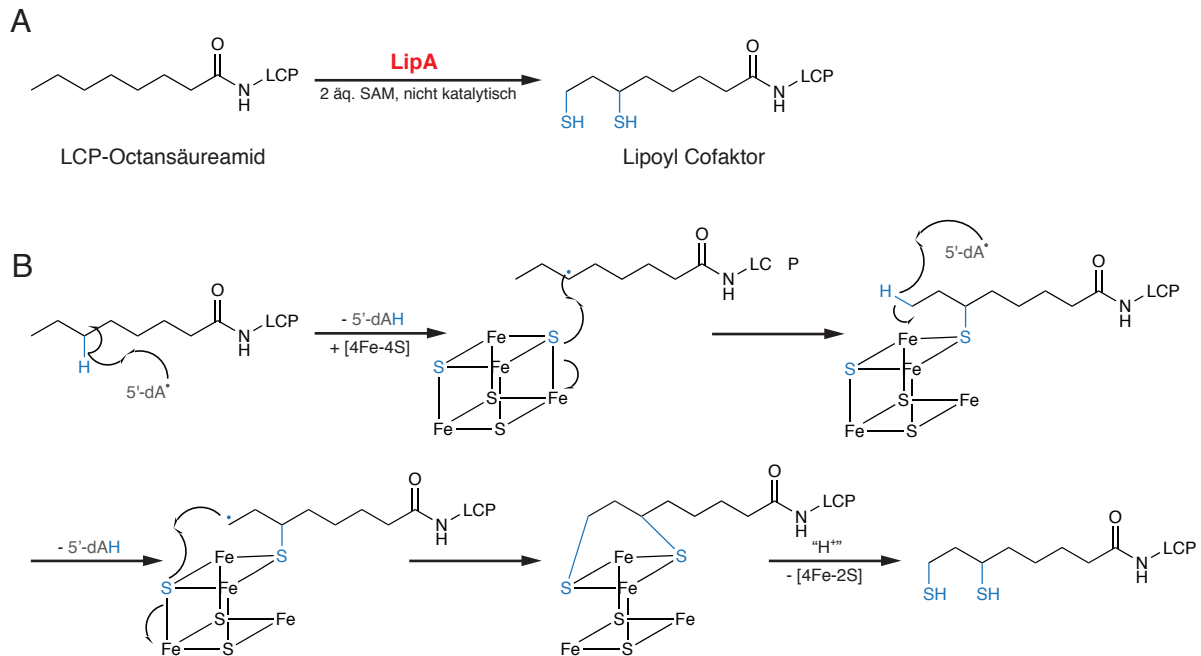


Abbildung 1.33: Übersicht über die von LipA katalysierte Reaktion. (A) Reaktionsgleichung der von LipA katalysierten Umsetzung von dem LCP-Octansäureamidaddukt in den Lipoyl-Cofaktor. Für die Reaktion werden zwei Äquivalente SAM benötigt. (B) Reaktionsmechanismus der in (A) gezeigten Reaktion. Der zweite in LipA gebundene [4Fe-4S]-Cluster wird bei der Synthese des Lipoyl-Cofaktors degradiert. Daher ist LipA wie BioB nur in der Lage einen Turnover zu katalysieren.

1.3.4 Methylthiotransferasen

Methylthiotransferasen (MTF) katalysieren den spezifischen Transfer von Methylthiolgruppen auf tRNA-Substrate und ribosomale Proteine (Abbildung 1.34a). Dabei werden tetraedrische (sp^3) wie auch planare (sp^2) Kohlenstoffzentren modifiziert (Anton et al., 2010; Arragain et al., 2010; Atta et al., 2010). Bei den MTFs handelt es sich um Radical SAM Enzyme, die in allen drei Domänen des Lebens gefunden werden. RimO und MiaB sind die am Besten charakterisierten Enzyme dieser Klasse. RimO ist für die spezifische Methylthiolierung des β -Kohlenstoffatoms des Aspartatrestes 89 des ribosomalen Proteins S12 verantwortlich (Anton et al., 2008). MiaB hingegen katalysiert den letzten Reaktionsschritt der Modifikation eines Adenosins in tRNA zu 2-Methylthio- N^6 -(threonylcarbamoyl)adenosin (Hernández et al., 2007; Pierrel et al., 2004; 2003). Durch spektroskopische Untersuchungen wie auch durch Mutationsstudien konnte gezeigt werden, dass beide Enzyme über zwei [4Fe-4S]-Cluster verfügen. Es wurde lange Zeit angenommen, dass der zweite [4Fe-4S]-Cluster die Funktion eines Schwefeldonors

wie der weitere Fe/S-Cluster in BioB oder LipA besitzt. Diese Funktion wurde angenommen, da RimO wie z.B BioB in ersten *in vitro*-Experimenten die Bildung maximal eines Äquivalents methylthiolierten Produkts katalysierte (Lee et al., 2009b).

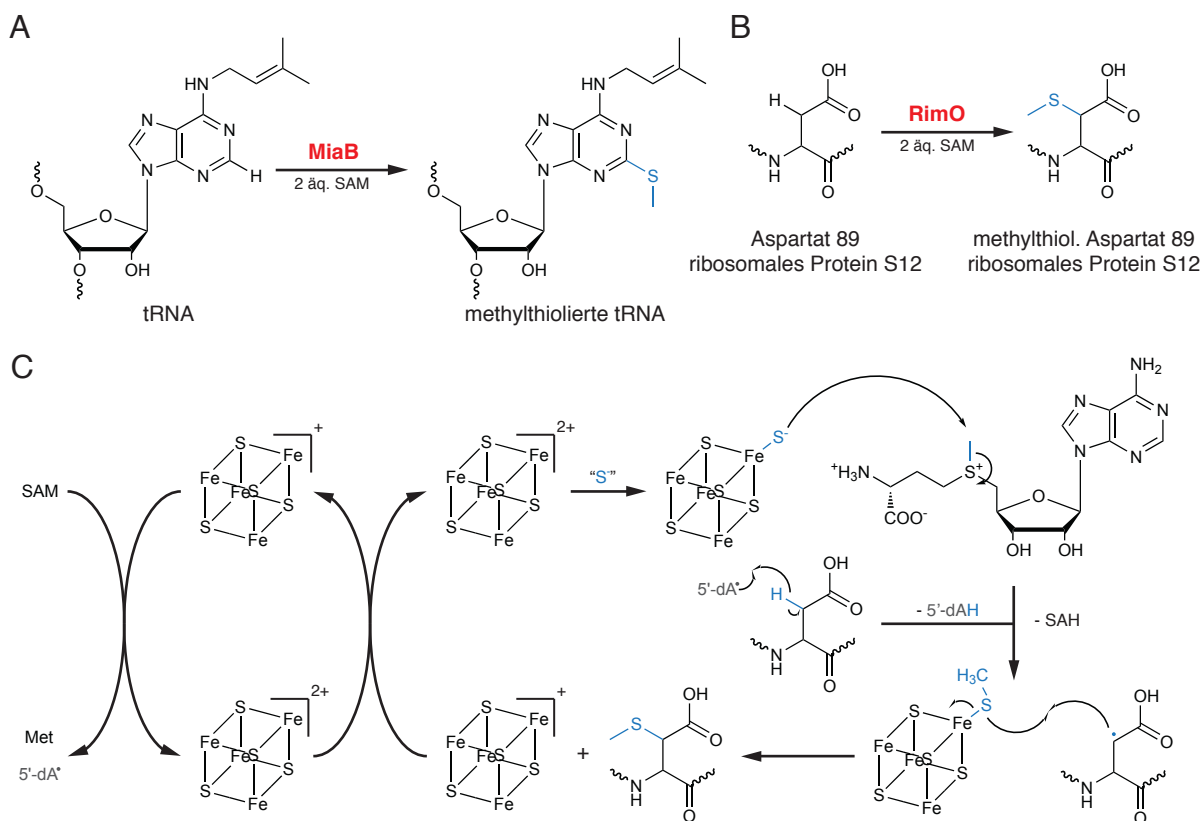


Abbildung 1.34: Übersicht über verschiedene durch Radical SAM Enzyme katalysierten Methylthiolierungen. (A) Reaktionsgleichung der von MiaB katalysierten Methylothiolierung eines sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffatoms einer bereits modifizierten Adenosingruppe in tRNA. (B) Reaktionsgleichung der Methylothiolierung eines sp^3 -hybridisierten Kohlenstoffatoms des Aspartatrestes 89 des ribosomalen Proteins S12 durch RimO. (C) Reaktionsmechanismus der von RimO katalysierten Methylothiolierung. SAM wird als Methylgruppendedonor und Radikalgenerator benötigt. Bei der Generierung des Thioethers handelt es sich um eine zwei-Elektronenoxidation. Da das 5'-dA-Radikal ein ein-Elektronenoxidationsmittel ist, wird für die Thioethererzeugung ein weiteres ein-Elektronen-Oxidationsmittel benötigt. Diese Funktion nimmt der zweite [4Fe-4S]-Cluster ein, an dem die zu übertragende Thiomethylgruppe zwischenzeitlich koordiniert ist. Der zweite [4Fe-4S]-Cluster kann den ersten Fe/S-Cluster nach einem Reaktionszyklus regenerieren.

Zusätzlich wurde die Bildung eines Selenoethers beobachtet, wenn RimO mit Natriumselenid anstatt Natriumsulfid rekonstituiert wurde. Aktuelle Ergebnisse widerlegen aber diese Funktion des zweiten [4Fe-4S]-Clusters. In der Studie von *Forouhar et al.* (Forouhar et al., 2013) konnte durch Zugabe von Natriumsulfid ein *in vitro*-Assay durchgeführt werden, in dem MiaB mehrere Turnover katalysierte. Wurde zum Vergleich Natriumselenid in ein Assay zugesetzt, der schon ein mit Sulfid rekonstituiertes Protein enthielt, wurde die Bildung eines Selenoether enthaltenen Adenosinderivats beobachtet. Die Studien deuteten darauf hin, dass der zweite [4Fe-4S] während der Reaktion nicht als Schwefeldonor fungiert und demnach nicht degradiert wird. Des

Weiteren konnte durch EPR-Studien die Interaktion des zweiten [4Fe-4S]-Clusters mit dem Selen eines Methylselenids nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte die Kristallstruktur von rekonstituierten RimO gelöst werden. Aufbauend auf den erhaltenen Ergebnissen wurde ein allgemeiner Mechanismus der Methylthiolierung vorgeschlagen (Abbildung 1.34b) (Forouhar et al., 2013).

1.3.5 Molybdopterin-Cofaktor-Biosyntheseprotein A

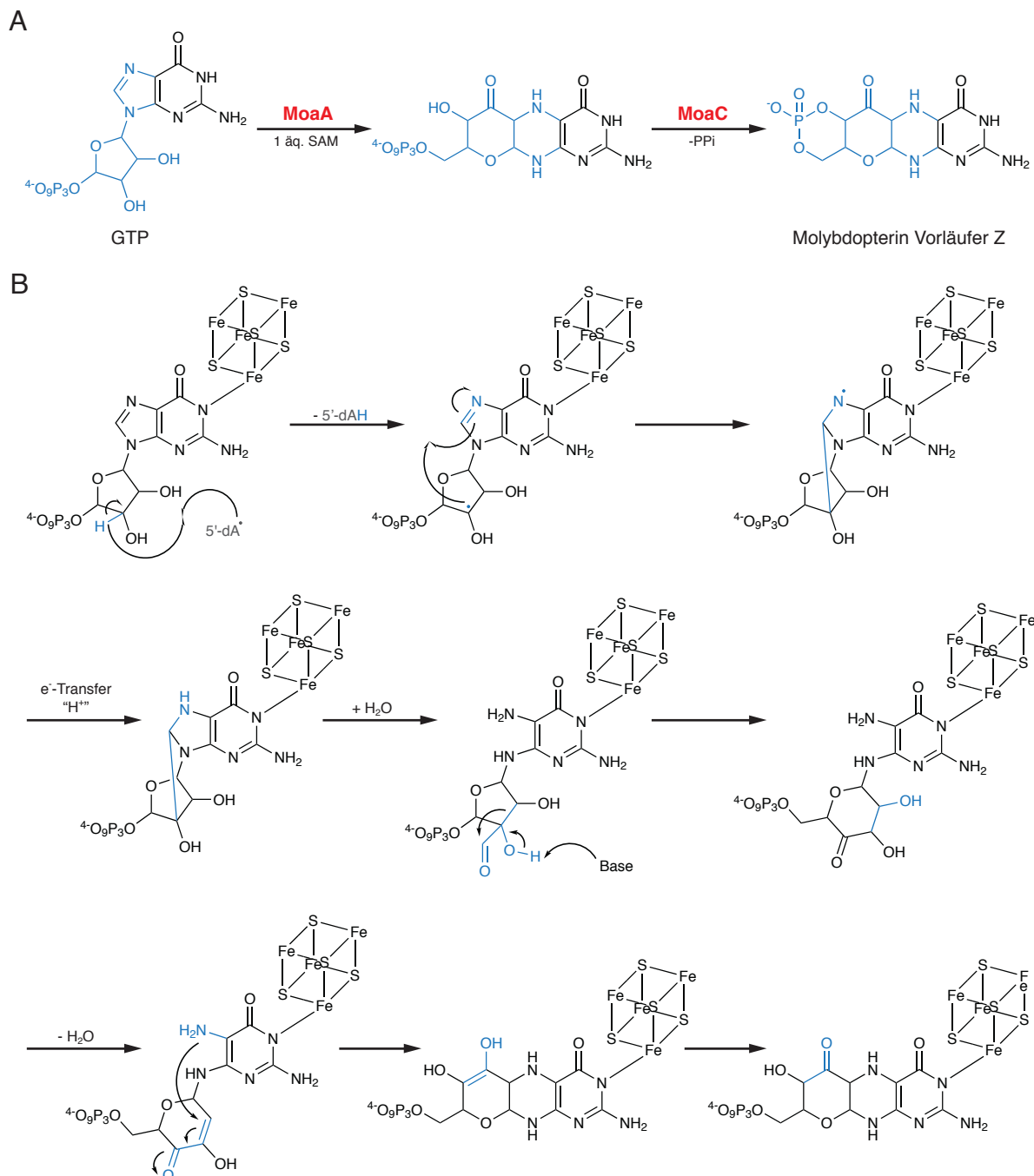


Abbildung 1.35: Übersicht über die von MoaA und MoaC katalysierte Umlagerung von GTP in den Molybdopterin-Vorläufer Z. (A) Reaktionsgleichungen der beiden Reaktionen. (B) Postulierter Reaktionsmechanismus der von MoaA katalysierten Umlagerung. Der zweite in MoaA gebundene [4Fe-4S]-Cluster dient als Elektronendonator für die Reduktion des Substrats. Nähere Beschreibungen des Mechanismus befinden sich im Text.

Das Molybdopterin-Cofaktor-Biosyntheseprotein A (MoaA) katalysiert die erste Reaktion der Molybdopterin Biosynthese aus GTP. Dabei bildet es zusammen mit dem Molybdopterin-Cofaktor-Biosyntheseprotein C (MoaC) aus GTP den Molybdopterin-Vorläufer Z (Abbildung 1.35a) (Hänzelmann et al., 2004). Der Molybdopterin-Cofaktor (MoCo) ist für Aktivität einiger Enzyme (z. B. die Sulfitoxidase) im menschlichen Körper essentiell. Ein angeborener MoCo-Mangel zeigt sich in neurologischen Ausfallerscheinungen, die relativ schnell zum Tod führen (Reiss, 2000; Reiss and Johnson, 2003). Bei MoaA handelt es sich um ein Radical SAM Enzym, das über zwei [4Fe-4S]-Cluster verfügt. Dem zweiten [4Fe-4S]-Cluster werden mehrere Funktionen zugeordnet, zum einen die Substratkoordination, die mit einer spezifischen Erkennung von GTP als Edukt verknüpft ist, und zum anderen eine strukturelle Funktion (Hänzelmann and Schindelin, 2004; 2006). Studien, in denen die Cysteingruppen des Bindungsmotivs des zweiten [4Fe-4S]-Clusters gegen Alaninreste ausgetauscht waren, resultierten in unlöslichen MoaA-Mutanten. Erst kürzlich konnte ein plausibler Vorschlag über den genauen Mechanismus, der von MoaA katalysierten Reaktion gemacht werden (Abbildung 1.35b) (Mehta et al., 2013). Durch Studien mit Deuterium-markierten GTP konnte gezeigt werden, dass im ersten Reaktionsschritt das Wasserstoffatom des C3'-Kohlenstoffes durch ein 5'-dA-Radikal abstrahiert wird. Anschließend erfolgt eine komplexe Umlagerungsreaktion, bei der der C8-Kohlenstoff zwischen die Kohlenstoffatome C2' und C3' migriert. Der darauf folgende Aufbau des mittleren 6-Rings erfolgt durch nucleophile Addition.

1.3.6 Pyrrolochinolinchinon-Biosyntheseprotein E

Bei Pyrrolochinolinchinon handelt es sich um einen Naturstoff ribosomalen Ursprungs, wie schon in Kapitel 1.2.7 erläutert wurde (Puehringer et al., 2008). An der Biosynthese ist ein Radical SAM Enzym (PqqE) beteiligt, das über zwei [4Fe-4S]-Cluster verfügt. Über die von PqqE katalysierte Reaktion ist bis heute wenig bekannt. Es konnte bis jetzt nur gezeigt werden, dass mit Eisen und Schwefel beladenes PqqE in der Lage ist, reduktiv SAM in Methionin und 5'-dA zu spalten. Eine Rekonstitution der Enzymaktivität war *in vitro* nicht möglich. In Assays mit PqqE, PqqA, SAM und einem Reduktionsmittel konnte keine Bildung eines neuen Produktes beobachtet werden (Wecksler et al., 2009). Weiterführende Studien zeigten, dass PqqE mit PqqD interagiert und dass PqqD ebenfalls mit dem Vorläuferpeptid wechselwirkt (Wecksler et al., 2010). Daraufhin wurden Assays, in denen zusätzlich PqqD hinzugefügt wurde, durchgeführt. Erneut war kein Umsatz an PqqA in ein neues Produkt zu beobachten. Als Bindungsstelle des zweiten [4Fe-4S]-Clusters werden drei Cysteinreste in einem CX₂CX₂₇C-Motiv verantwortlich gemacht.

1.3.7 Radical SAM Reifungsenzyme der Fe-Fe-Hydrogenase HydA

Hydrogenasen katalysieren die reversible Oxidation von molekularem Wasserstoff. Aus diesem Grund, sind sie für die Forschung besonders interessant, da mit ihrer Hilfe das Problem der Wasserstoffgenerierung für z. B. durch Wasserstoff betriebene Fahrzeuge, gelöst werden könnte. Die Fe-Fe-Hydrogenase HydA benötigt für diese Reaktion einen komplexen Cofaktor, den sogenannten H-Cluster (Abbildung 1.36) (Mulder et al., 2010; Peters et al., 1998). Dieser besteht aus einem cubanen [4Fe-4S]-Cluster, der über das Schwefelatom eines Cysteinrestes mit einem [2Fe]-Cluster verbunden ist. Dieser [2Fe]-Cluster koordiniert drei Carbonyl-, zwei Cyanid- und einen Dithiomethylaminliganden, die den Cluster stabilisieren. Die Synthese des [4Fe-4S]-Clusters verläuft über die Standard-Biosynthesemaschinerie, wohin gegen die Synthese des [2Fe]-Clusters durch drei Enzyme des *hyd*-Operons (HydE, HydF, HydG) katalysiert wird. Bei HydE und HydG handelt es sich um Radical SAM Enzyme, dessen Funktionen im Folgenden detailliert erläutert werden. Die Assemblierung des H-Clusters wird auf HydF durchgeführt. HydF dient daher als Scaffoldprotein, das als letzter Schritt der Biosynthese den fertigen H-Cluster auf HydA überträgt (Brazzolotto et al., 2006; Czech et al., 2010; McGlynn et al., 2008; Mulder et al., 2010; Posewitz et al., 2004).

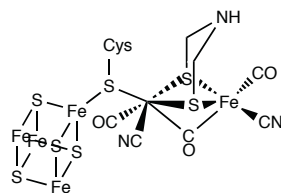


Abbildung 1.36: Struktur des H-Clusters aus der Fe-Fe-Hydrogenase HydA.

1.3.7.1 HydE

Bei HydE handelt es sich um ein Radical SAM Enzym, das zwei [4Fe-4S]-Cluster bindet (Posewitz et al., 2004). Die Präsenz des zweiten Clusters konnte unwiderruflich durch einen Alanscan des Bindungsmotivs des für die SAM-Spaltung erforderlichen Fe/S-Clusters erbracht werden. HydE-Mutanten, die nicht mehr in der Lage waren, diesen Cluster zu koordinieren, enthielten weiterhin 4 Äquivalente Eisen und Schwefel. Durch UV-Vis und EPR-Studien konnte der zweite durch ein CX_7CX_2C -Motiv gebundene Fe/S-Cluster als [4Fe-4S]-Zentrum identifiziert werden (Rubach et al., 2005). Über die Funktion von HydE ist wenig bekannt. Es wird angenommen, dass das Enzym für die Biosynthese Dithiomethylaminliganden verantwortlich ist, da HydG die Synthese der CO- und CN-Liganden katalysiert. Durch eine *in vitro*-Rekonstitution der Biosynthese konnte dies jedoch noch nicht gezeigt werden. Daher ist die Funktion des zweiten [4Fe-4S]-Clusters auch weiterhin unbekannt. Die Theorien umfassen dabei strukturelle Funktio-

nen oder wie bei BioB und LipA eine Funktion als Schwefeldonor für den Bithiomethylaminliganden.

1.3.7.2 HydG

Die Funktion des Radical SAM Enzyms HydG in der Biosynthese des H-Clusters ist detailliert untersucht worden (Driesener et al., 2010; Posewitz et al., 2004; Shepard et al., 2010). Es wurde gezeigt, dass HydG für die Erzeugung der CN- und CO-Liganden des H-Clusters verantwortlich ist. Es verwendet Tyrosin als Substrat. Als Produkte werden *p*-Cresol und jeweils ein CN- und CO-Ligand gebildet (Abbildung 1.37a). Das Radical SAM Enzym HydG verfügt über einen weiteren [4Fe-4S]-Cluster, der über ein CX₂CX₂₂C-Motiv koordiniert ist. In aktuellen Studien von Nicolet et al. konnte durch die Mutation zweier Cysteine zu Serin gezeigt werden, dass der zweite [4Fe-4S]-Cluster für die Synthese des CO-Liganden essentiell ist (Nicolet et al., 2010).

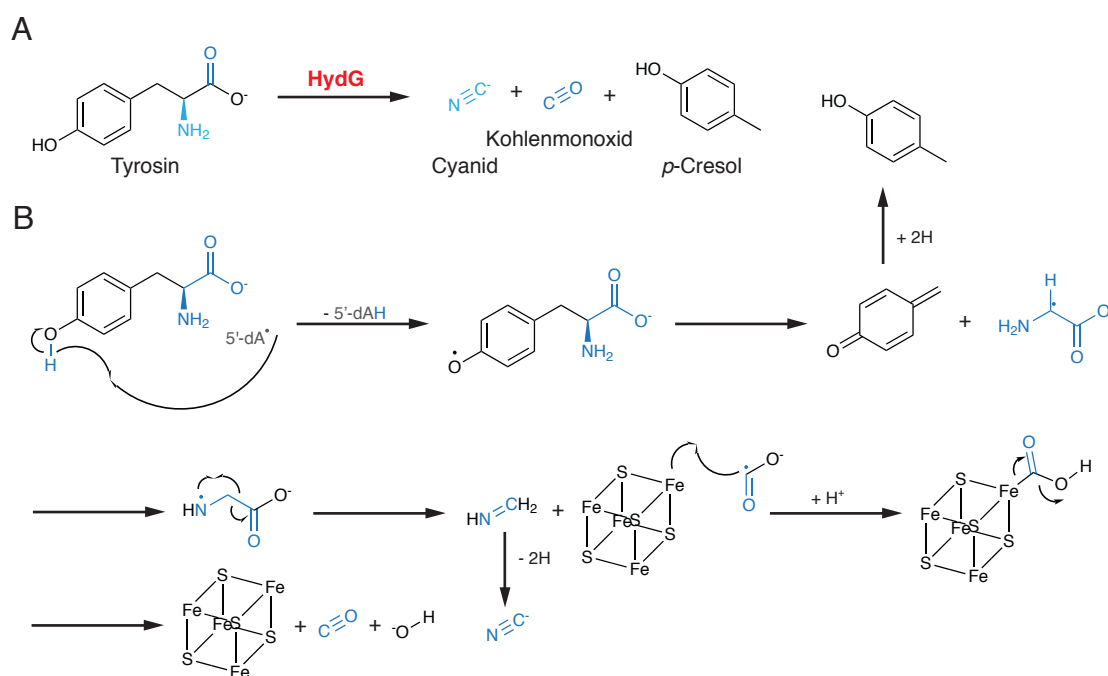


Abbildung 1.37: Überblick über die von HydG katalysierte Reaktion. (A) Reaktionsgleichung der Umsetzung von Tyrosin in jeweils ein Molekül Kohlenmonoxid, Cyanid und *p*-Cresol durch HydG. (B) Reaktionsmechanismus der von HydG katalysierten Reaktion. Es wird davon ausgegangen, dass bei der Umsetzung von Tyrosin ein Äquivalent SAM verbraucht wird. Der zweite in HydG gebundene [4Fe-4S]-Cluster ist für die Erzeugung von Kohlenmonoxid aus dem CO₂-Radikal verantwortlich.

Die erzeugte HydG-Mutante war nur in der Lage, den CN-Liganden zu synthetisieren. Daraufhin war es möglich, einen Mechanismus der Reaktion zu postulieren (Abbildung 1.37b). Es wird angenommen, dass im ersten Reaktionsschritt Tyrosin in *p*-Cresol und Dehydroglycin gespalten wird. Das erzeugte Dehydroglycin wird im nächsten Reaktionsschritt mit Hilfe des durch den

ersten [4Fe-4S]-Cluster generierten 5'-dA-Radikals in Methylimin und das CO_2^- -Radikal gespalten. Durch eine zwei-Elektronenoxidation wird Methylimin in Cyanid überführt. Für die Synthese des CO-Liganden aus dem CO_2^- -Radikal wird ein ein-Elektronen-Oxidationsmittel benötigt. Zu dieser Klasse gehören auch [4Fe-4S]-Cluster. Daher wird angenommen, dass der dritte Reaktionsschritt am zweiten [4Fe-4S]-Cluster unter einer teilweisen Bildung eines [4Fe-4S]-CO-Komplexes stattfindet. Die Bildung des Komplexes würde auch den experimentellen Sachverhalt erklären, dass während der Umsetzung von Tyrosin in CN und CO niemals die Bildung von genau einem Äquivalent CO beobachtet wird.

1.3.8 Radical SAM Enzyme, die Glycyl-Radikale generieren

Eine wichtige Unterklasse der Radical SAM Enzyme bilden die Glycylradikal aktivierende Enzyme (GRAE). Diese nutzen das generierte 5'-dA-Radikal, um an einem anderen Protein das am α -Kohlenstoff gebundene Wasserstoffatom einer Glycingruppe zu abstrahieren. Das auf diese Weise erzeugte Glycylradikal wird durch captodative Effekte stabilisiert und ist daher besonders stabil. Unter anaeroben Bedingungen wurden Halbwertszeiten von mehreren Stunden beobachtet. Durch die Generierung des Glycylradikals werden die Substratproteine aktiviert und selbst zu Enzymen, den sogenannten Glycylradikal Enzymen (Eklund and Fontecave, 1999; Selmer et al., 2005). Beispiele hierfür sind die Pyruvat-Formiat-Lyase und die anaerobe Ribonucleotidreductase. Die in den Systemen vorkommenden Glycylradikal-aktivierenden Radical SAM Enzyme besitzen einen [4Fe-4S]-Cluster. Darüber hinaus sind GRAE bekannt, die mehrere Fe/S-Cluster binden. Diese werden im Folgenden näher beschrieben.

1.3.8.1 Aktivierungsenzym der *p*-Hydroxyphenylacetat-Decarboxylase

Die *p*-Hydroxyphenylacetat-Decarboxylase (Hpd) katalysiert den letzten Reaktionsschritt in der Fermentation von Tyrosin zu *p*-Cresol in verschiedenen *Clostridium*-Spezies (Abbildung 1.38) (Selmer et al., 2005).

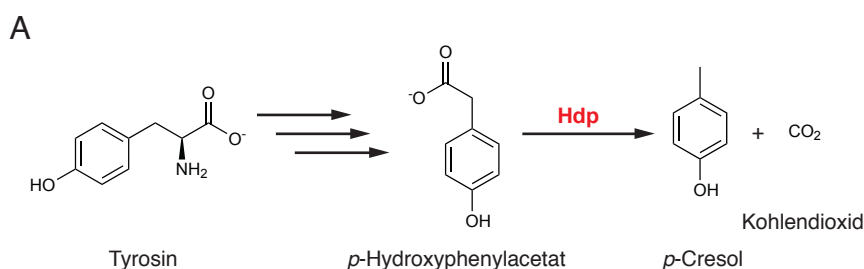


Abbildung 1.38: Reaktionsgleichung der von Hpd katalysierten Umsetzung von *p*-Hydroxyphenylacetat in *p*-Cresol und Kohlenstoffdioxid.

Bei der *p*-Hydroxyphenylacetat-Decarboxylase handelt es sich um ein Glycylradikal Enzym, dass durch ein GRAE, das mindestens zwei [4Fe-4S]-Cluster enthält, aktiviert wird. Es konnte gezeigt werden, dass das GRAE nach erfolgreicher Reinigung 7 bis 8 Äquivalente Eisen und 6 bis 7 Äquivalente Schwefel bindet. Durch EPR-Studien konnten die gebundenen Cluster als [4Fe-4S]-Cluster identifiziert werden (Yu et al., 2006). Leider war nur ein Bruchteil des gereinigten Enzyms *in vitro* aktiv. Genauere bioinformatische Untersuchungen der Proteinsequenz ergaben, dass das GRAE über zwei weitere putative Fe/S-Cluster-Bindungsstellen verfügt. Weitere Studien wurden bis jetzt nicht durchgeführt. Daher ist die genaue Funktion des weiteren bzw. der weiteren Fe/S-Cluster noch unbekannt.

1.3.8.2 Aktivierungsenzym der Glyceroldehydratase aus *Clostridium butyricum*

Glyceroldehydratasen katalysieren die Reaktion von Glycerol zu 3-Hydroxypropionaldehyd im Umwandlungsprozess von Glucose zu 1,3-Propandiol (Abbildung 1.39a). Bei diesen Enzymen handelt es sich meistens um Coenzym B12-abhängige Dehydratasen. Dies ist jedoch in *Clostridium butyricum* nicht der Fall. Hier wurde ein Enzym gefunden, das eine konservierte Aminosäuresequenz besitzt, an der ein Glycinradikal durch ein GRAE gebildet werden kann. Das GRAE wurde als Radical SAM Enzym identifiziert. Laut bioinformatischen Studien ist es in der Lage bis zu drei [4Fe-4S]-Cluster zu koordinieren. Experimentell wurde dieser Befund jedoch noch nicht nachgewiesen. Interessant ist, dass das Enzym SAM nicht in Met und das 5'-dA-Radikal spaltet, sondern in 5'-Deoxy-5'-methylthioadenosin und 3-Amino-3-carboxylpropylradikal (Abbildung 1.39b). Es ist damit das erste Radical SAM Enzym an dem gezeigt wurde, dass auch eine andere reduktive Spaltung des SAM-Moleküls möglich ist (Derrick and Lanzilotta, 2011).

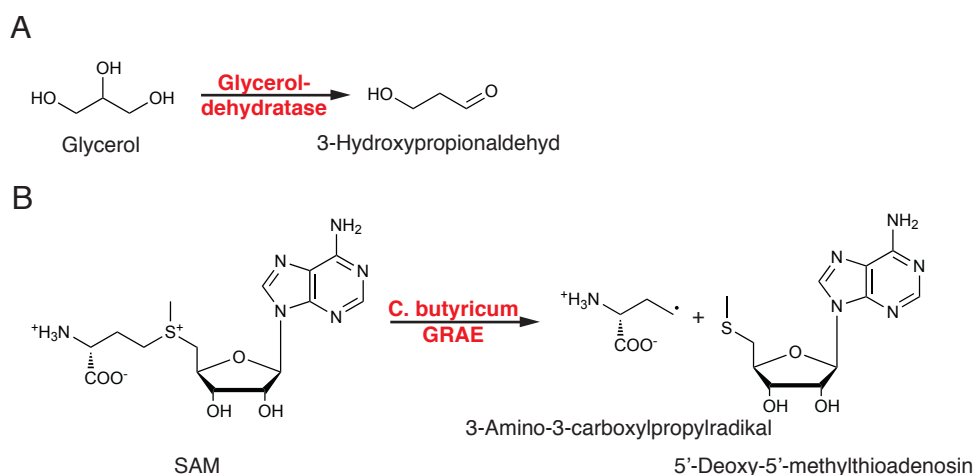


Abbildung 1.39: Reaktionsgleichung der von Glyceroldehydratasen katalysierten Reaktion von Glycerol in 3-Hydroxypropionaldehyd (A). (B) Für die Aktivierung der Glyceroldehydratase in *C. butyricum*-Spezies ist ein GRAE verantwortlich, dass SAM nicht in Met und das 5'-dA-Radikal spaltet, sondern in 5'-Deoxy-5'-methylthioadenosin und das 3-Amino-3-carboxylpropylradikal.

1.3.8.3 Aktivierungsenzym der Benzylsuccinat-Synthase

Die Benzylsuccinat-Synthase (Bss) katalysiert die Synthese von Benzylsuccinat aus Toluol und Fumarsäure (Abbildung 1.40) und damit den ersten Reaktionsschritt im Toluolmetabolismus von *Thauera aromatica* (Leuthner et al., 1998). Über das Enzym-aktivierende GRAE ist wenig bekannt. Bioinformatische Studien deuten auf die Präsenz zwei weiterer [4Fe-4S]-Cluster-Bindungsstellen hin. Diese besitzen eine ähnliche Anordnung wie in dem Hpd-GRAE (Kapitel 1.3.8.1), so dass davon ausgegangen wird, dass die in beiden Enzymen zusätzlich gebundenen Fe/S-Cluster die gleiche Funktion besitzen (Li and Marsh, 2006a; 2006b).

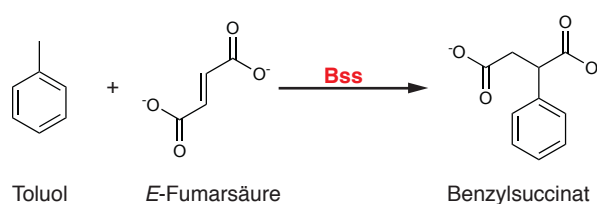


Abbildung 1.40: Reaktionsgleichung der von Bss katalysierten Spaltung von Benzylsuccinat in Toluol und *E*-Fumarsäure.

1.3.9 Butirosin-Biosyntheseprotein N

Butirosin (Abbildung 1.41a) gehört zur Klasse der antibakteriell aktiven Aminoglycoside, zu der z. B. auch Kanamycin zählt. An seiner Biosynthese ist unter anderem ein Radical SAM Enzym, das Butirosin-Biosyntheseprotein N (BtrN), involviert (Yokoyama et al., 2007). Es katalysiert die zwei-Elektronen Oxidation von 2-Deoxy-*scyllo*-inosamin (DOIA) zu Amino-2-deoxy-*scyllo*-inosose (Amino-DOI) (Abbildung 1.41b), also die Umwandlung einer Hydroxylgruppe zu einer Carbonylfunktion. In ersten Studien, in denen BtrN chemisch rekonstituiert und anschließend mit EDTA behandelt wurde, um unspezifisch gebundenes Fe(II/III) zu entfernen, konnte in BtrN nur ein [4Fe-4S]-Cluster nachgewiesen werden (Yokoyama et al., 2008). Dieser Befund erwies sich aber als falsch, wie eine Studie von *Grove. et al* zeigte (Grove et al., 2010). In dieser Arbeit wurde BtrN mit den Genen des *isc*-Operons coexprimiert und anschließend anaerob gereinigt. Es wurde ein Eisengehalt von 7.7 Äquivalenten und ein Schwefelgehalt von 8.8 Äquivalenten bestimmt. Durch weitere Untersuchungen, die den Austausch der Cysteine des CXXXCXXC-Motivs durch Alanin beinhalteten, konnte eindeutig die Präsenz eines zweiten [4Fe-4S]-Clusters nachgewiesen werden. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde ein Reaktionsmechanismus (Abbildung 1.41c) vorgeschlagen, der identisch zu dem bereits zuvor postulierten Mechanismus von AtsB ist. Da es sich bei dem durch den ersten [4Fe-4S]-Cluster generierten 5'-dA-Radikal um ein ein-Elektronen-Oxidationsmittel handelt, wird für die zwei-Elektronen-Oxidation von DOIA in Amino-DOI ein weiteres ein-Elektronen-Oxidationsmittel benötigt. Diese Rolle wird dem

zweiten [4Fe-4S]-Cluster zugesprochen, der nach erfolgreicher Deprotonierung der Hydroxylgruppe DOIA koordinieren kann. Nach Abstraktion des Wasserstoffatoms vom α -Kohlenstoff wird ein Elektron auf den zweiten [4Fe-4S]-Cluster transferiert und Amino-DOI gebildet. Es ist unklar, ob das Elektron zur Regeneration anschließend auf einen externen Elektronenakzeptor oder auf den ersten [4Fe-4S]-Cluster transferiert wird.

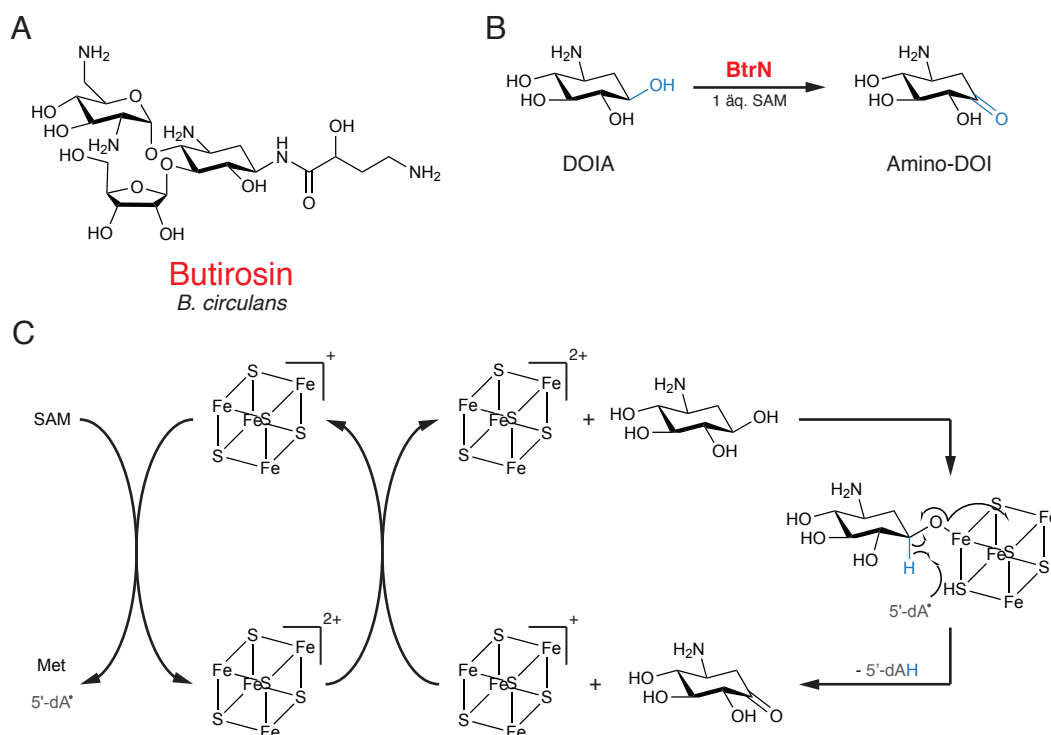


Abbildung 1.41: Übersicht über die von BtrN katalysierte Reaktion in der Butirosin-Biosynthese. (A) Strukturformel von Butirosin. (B) Reaktionsgleichung der von BtrN katalysierten Oxidation von DOIA in Amino-DOI. Es wird ein Äquivalent SAM pro Turnover konsumiert. (C) Reaktionsmechanismus der zwei-Elektronenoxidation von DOIA in Amino-DOI. Wie bei den von RimO und MiaB katalysierten Oxidationsreaktionen dient der zweite [4Fe-4S]-Cluster als zweites ein-Elektronenoxidationsmittel.

1.3.10 Reifungsenzyme von Arylsulfatasen

Sulfatasen katalysieren die Hydrolyse von Sulfateestern. Eine Unterklasse dieser Enzyme bilden die Arylsulfatasen, die in ihrem katalytischen Zentrum eine Formylglycingruppe besitzen. Dieser Formylglycinrest ist in eukaryotischen wie auch prokaryotischen Arylsulfatasen konserviert und ist für dessen Aktivität essentiell (Boltes et al., 2001; Lukatela et al., 1998). Er wird in anaeroben prokaryotischen Systemen durch Oxidation einer Cysteingruppe oder Seringruppe erzeugt (Abbildung 1.42a). Diese Oxidationsreaktion wird durch Radical SAM Enzyme katalysiert, den sogenannten Anaeroben-Sulfatase-Modifizierungsenzymen (ASME). Das am Besten charakterisierte ASME ist AtsB aus *Klebsiella pneumoniae* (Benjdia et al., 2007; Fang et al., 2004; Grove et al., 2008; Marquardt et al., 2003; Szameit et al., 1999). In Studien von Grove et al. wurde durch Bestimmung des Eisen- und Schwefelgehalts, wie auch durch Mössbauer-Spektroskopie

gezeigt, dass AtsB drei [4Fe-4S]-Cluster bindet. An einem aus 23 Aminosäuren bestehenden Teilstück der Arylsulfatase AtsA konnte durch massenspektrometrische Untersuchungen die Modifikation einer Cysteingruppe in den Formylglycinrest nachgewiesen werden. Da es sich bei der Reaktion einer Thiolgruppe zu einer Carbonylfunktion um eine zwei-Elektronen-Oxidation handelt, das generierte 5'-dA-Radikal aber nur ein ein-Elektronen-Oxidationsmittel ist, muss ein weiterer ein-Elektronenakzeptor an der Reaktion beteiligt sein. *Grove et al.* schlugen dafür einen der zusätzlich gebundenen [4Fe-4S]-Cluster vor. Nachdem durch weitere Studien gezeigt werden konnte, dass die SAM-Spaltungsaktivität des Enzyms ohne Protein- bzw. Peptidsubstrat drastisch abnimmt, wenn jeweils die Cysteine eines der weiteren [4Fe-4S]-Cluster-Bindungsmotive gegen Alanine ausgetauscht werden, wurde ein Mechanismus der Reaktion vorgeschlagen (Abbildung 1.42b). Es wird aktuell angenommen, dass einer der zwei zusätzlich gebundenen [4Fe-4S]-Cluster für die Koordinierung des Peptidsubstrats und die anschließende ein-Elektronenoxidation verantwortlich ist. Der zweite zusätzlich gebundene Fe/S-Cluster transportiert das durch den anderen Fe/S-Cluster aufgenommene Elektron auf den für die SAM-Spaltung benötigten [4Fe-4S]-Cluster zurück. Das Enzym wäre demnach in der Lage, sich selbst zu regenerieren und müsste nur einmal mit Hilfe eines externen Reduktionsmittels aktiviert werden. Die verminderte SAM-Spaltungsaktivität der AtsB-Alaninmutanten sprechen für diesen Mechanismus.

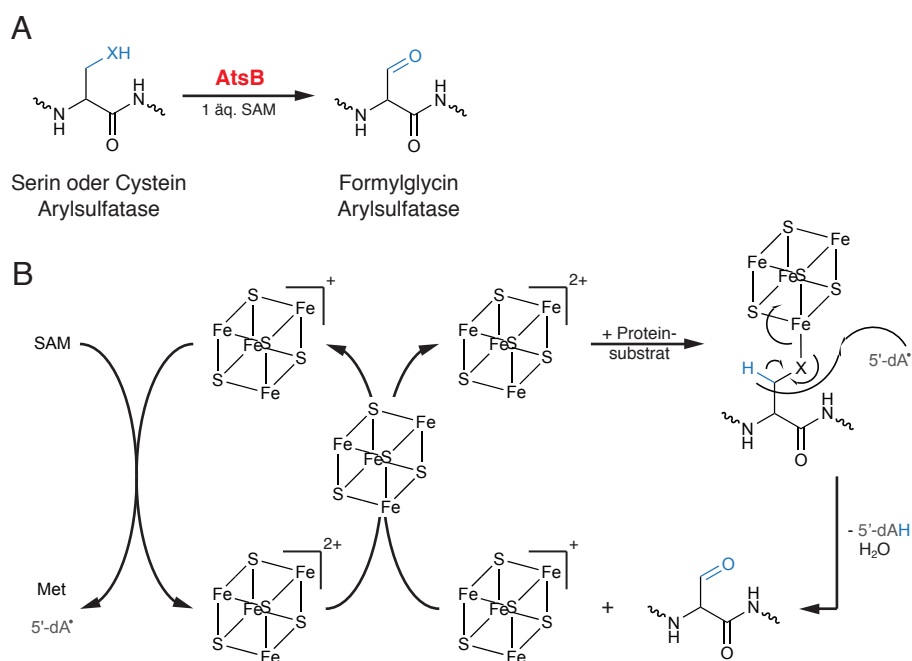


Abbildung 1.42: Übersicht über die von AtsB katalysierte Reaktion. (A) Reaktionsgleichung der vom Radical SAM Enzym AtsB katalysierten zwei-Elektronenoxidation einer Thiol- oder Hydroxylfunktion. (B) Reaktionsmechanismus der Reaktion. Wie bei MiaB, RimO und BtrN dient der zweite [4Fe-4S]-Cluster neben dem 5'-dA-Radikal als zweites ein-Elektronenoxidationsmittel.

1.4 Aufgabenstellung

Ziel dieser Doktorarbeit war es die Enzyme, die an der Thioetherbrückenbildung in Subtilosin A und dem Sporulation Killing Factor beteiligt sind, zu charakterisieren und den Mechanismus der Reaktion zu erforschen.

Dazu sollten zunächst die Proteine AlbA und SkfB als Radical SAM Enzyme charakterisiert werden. Durch UV-Vis- und EPR-spektroskopische Untersuchungen von AlbA und SkfB sowie von AlbA- und SkfB-Varianten sollte die Existenz zweier [4Fe-4S]-Cluster, die in den Diplomarbeiten von Michael Gattner (Gattner, 2010) und Leif Flühe (Flühe, 2010) schon vermutet wurde, bewiesen werden.

Anschließend sollte gezeigt werden, dass AlbA für die Biosynthese der Thioetherbrücken in Subtilosin A und SkfB für die Biosynthese der Thioetherbrücken in SKF verantwortlich ist. Durch heterolog expremiertes SkfA sollte zusätzlich die Substratspezifität bezüglich der Donor- und Akzeptoraminosäure in der SkfB katalysierten Reaktion untersucht werden. Mit Hilfe von UV-Vis-Interaktionsstudien und Vorläuferpeptidmodifikationsassays mit AlbA- und SkfB-Varianten sollte die Funktion der zweiten in den Enzymen gebundenen [4Fe-4S]-Cluster herausgefunden werden. Ebenfalls sollte der Einfluss des jeweiligen Leaderpeptids auf die Reaktion untersucht werden.

Auf Grundlage der erzielten Ergebnisse sollten die postulierten Biosynthesen von Subtilosin A und SKF überarbeitet werden. Darüber hinaus sollte ein plausibler Mechanismus für die Generierung der Thioetherbrücken in Sactipeptiden vorgeschlagen werden. Abschließend sollte durch *Genomic Mining* weitere Sactipeptid produzierende Gencluster identifiziert werden.

Die Arbeit baut direkt auf den Ergebnissen, die in der Diplomarbeit von Leif Flühe (Flühe, 2010) erzielt wurden, auf.

2. Materialien

2.1 Geräte

Tabelle 2.1: Überblick über die verwendeten Geräte einschließlich Hersteller und genauer Typenbezeichnung.

Gerät	Hersteller und Typenbezeichnung
Anaerobes Zelt	Coy Lab Products Type A and B Anaerobic Chamber
Analysewaage	Sartorius
Autoklav	Tuttnauer 5075 ELV Federgari Autoclavi SPA FVA3/A1
Anaerobisierungssystem	Eigenbau Albert-Ludwig-Universität Freiburg
Brutschrank	Köttermann 2736
Clean-Bench	Antair BSK
Dokumentationsgerät für DNA-Agarosegele und SDS-Polyacrylamidgele	Cybertech CS1 Videokamera Mitsubishi Video Copy Processor Thermodrucker
Elektrophoreseanlagen	Agarosegelkammer (hergestellt von der Philipps-Universität Marburg) BioRad MiniProtean 3 Gelkammer
Elektroporationspulsler	BioRad Gene Pulser II Electroporator
EPR-Spektrometer	Bruker ESP 300E
FPLC-Anlage	Amersham Pharmacia FPLC-System 250: Gradienten-Programmer GP-250, Pumpen P-500, Uvicord Optische Einheit UV-1 ($\lambda = 280 \text{ nm}$), Uvicord Kontrolleinheit UV-1, Injektionsventil V-7, 2-Kanal Flachbrettschreiber REC-102, 3-Wege Magnetventil PSV-100, Fraktionskollektor FRAC-1000 Äkta Purifier 900 FPLC-System: Box 900, pH/C 900, UV-900, P-900, Frac-900
French-Press	SLM Aminco French Pressure Cell Press 5.1 Thermo Spectronic Standard Cell 40 KP
LITQ-FT-ICR-Massenspektrometer	Thermo Fischer Scientific
Gefriertrocknungssystem	Christ-Alpha 2-4 LSC

Gerät	Hersteller und Typenbezeichnung
Heizschüttler	Eppendorf Thermomixer Comfort
HPLC-Anlage	Agilent Series 1100/1200 HPLC-System: quartäre Pumpe G1311A, Fraktionskollektor G1364A, Thermostat G1330B, UV Detektoreinheit G1314C, Säulentemperaturregeleinheit G1316A, Autosampler G1367A
Luftschüttler	New Brunswick Scientific Series 25 Incubator Shaker New Brunswick Scientific Innova 4300 Incubator Shaker
pH-meter	Schott CG 840
Photometer	Pharmacia Biotech Ultraspec 3000 Thermo Scientific Nanodrop 1000
Pipetten	Eppendorf Reference Serie
Speed-Vac	Eppendorf Concentrator 5301
Thermocycler	Eppendorf Mastercycler Personal
Vortexer	Scientific Industries Vortex Genie 2
Wasser-Deionisierungsanlage	Seral Seralpur Pro90CN
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5415D Heraeus Biofuge Pico Heraeus Megafuge 1.0R Sorvall RC-5B Plus (SLA-3000, SLC-4000) Sorvall RC 6+ (F21S-8x50y)

2.2 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Nicht in Tabelle 2.2 aufgeführte Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) in p.a. Qualität erworben.

Tabelle 2.2: Zusammenfassung der verwendeten Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Hersteller (Vertriebsort)	Produkt
Applichem (Darmstadt, Deutschland)	Ampicillin, Kanamycin, IPTG, Hefeextrakt, Comassie Brilliant Blue G und R250, Agar Nr.1, Dithiothreitol

Hersteller (Vertriebsort)	Produkt
Brand (Wertheim, Deutschland)	Einmalküvetten Plastbrand PS
Carl Roth GmbH (Karlsruhe)	Tris, Hepes
Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Deutschland)	<i>Paenibacillus larvae</i> DNA (DSM 7030)
Eppendorf (Hamburg, Deutschland)	1.5 und 2.0 mL Reaktionsgefäße
Eurogentech (Seraing, Belgien)	Agarose, Elektroporationsküvetten
GATC (Konstanz, Deutschland)	DNA-Sequenzierung
GE Healthcare (Freiburg, Deutschland)	HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade, HiLoad 26/10 Q Sepharose High performance, HiPrep 26/10 Desalting, Superdex 200 10/300
Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)	E. coli BL21 (DE3), E. coli TOP10
Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)	125/2 Nucleodur 100-3 C18ec, 250/12 Nucleodur C18ec, 250/4.6 Nucleodur C18 HTec
Merck (Darmstadt, Deutschland)	L-Methionin, pET-28a(+), pET-48b(+)
Millipore (Billerica, MA, USA)	Dialysemembran (Porengröße: 25 nm), Amicon Ultra-15 Konzentratoren
New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)	Phusion DNA-Polymerase, Desoxyribonukleotide, 100 bp-DNA-Ladder, 1 kb-DNA-Ladder, Proteinmarker, Restriktionsendonukleasen
Phenomenex (Torrance, CA, USA)	Jupiter 5u C4 300A 150x2.00 mm 5µm
PSL GmbH (Heidelberg, Deutschland)	Vorläuferpeptide
Qiagen (Hilden, Deutschland)	QIAprep spin Miniprep Kit, QIAquick Gel Extraction Kit, QIAquick PCR Purification Kit, Ni ²⁺ -NTA-Agarose, Kristallisationsscreens
Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)	Pipettenspitzen, Falcon Tubes (15 und 50 mL)
Serva (Heidelberg, Deutschland)	Bromphenolbau, Triton-X
Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)	Amberlite XAD16, Carboxypeptidasen, Oligonukleotide, Thermolysin
Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)	Hypercarb 100x2.1 mm 5µm
VWR (Darmstadt, Deutschland)	Sterilfilter (Porengröße: 200 nm)
Wilmad-Labglass (Vineland, NJ, USA)	4mm CFQ Non-Precision EPR Tube

2.3 Oligonukleotide

Die, in dieser Arbeit verwendeten, Oligonukleotid-Primer sind in Tabelle 2.3 zusammengefasst. Sie wurden entweder zur Amplifikation von Zielgenen oder zur spezifischen Mutagenese dieser verwendet.

Tabelle 2.3: Übersicht über die in den Polymerasekettenreaktionen verwendeten Primern. Restriktionsenzymschnittstellen sind unterstrichen.

Primername	Oligonukleotidsequenz	Restriktionsenzym	Vektor	Zielgen
LF055 (A1)	GTG CGT CAG TTC AAA GGT GGC GTG CAG	SLIM Mutagenese ¹	pETM-10	<i>albA_C129A</i> , <i>C133A,C136A</i> ²
LF057 (B1)	TTG GAA AGC TCA CCT GAA GCG CTC GG	SLIM Mutagenese ¹	pETM-10	<i>albA_C129A</i> , <i>C133A,C136A</i> ²
LF056 (B2)	ATA AGC GTG GGC GGC TTT CAA ATT AGC GCG GTG CGT CAG TTC AAA GGT GGC	SLIM Mutagenese ¹	pETM-10	<i>albA_C129A</i> <i>C133A C136A</i>
LF058 (A2)	CGC GCT AAT TTG AAA GCC GCC CAC GCT TAT TTG GAA AGC TCA CCT GAA GCG	SLIM Mutagenese ¹	pETM-10	<i>albA_C129A</i> <i>C133A C136A</i>
LF065 (B2)	ATA ACA GTG GGC GCA TTT CAA ATT AGC GCG GTG CGT CAG TTC AAA GGT GGC	SLIM Mutagenese ¹	pETM-10	<i>albA_C129A</i>
LF066 (A2)	CGC GCT AAT TTG AAA TGC GCC CAC TGT TAT TTG GAA AGC TCA CCT GAA GCG	SLIM Mutagenese ¹	pETM-10	<i>albA_C129A</i>
LF067 (B2)	ATA ACA GTG GGC GGC TTT CAA ATT ACA GCG GTG CGT CAG TTC AAA GGT GGC	SLIM Mutagenese ¹	pETM-10	<i>albA_C133A</i>
LF068 (A2)	CGC TGT AAT TTG AAA GCC GCC CAC TGT TAT TTG GAA AGC TCA CCT GAA GCG	SLIM Mutagenese ¹	pETM-10	<i>albA_C133A</i>

Primernamen	Oligonukleotidsequenz	Restriktionsenzym	Vektor	Zielgen
LF069 (B2)	ATA AGC GTG GGC GCA TTT CAA ATT ACA GCG GTG CGT CAG TTC AAA GGT GGC	SLIM Mutagenese ¹	pETM-10	<i>albA_C136A</i>
LF070 (A2)	CGC TGT AAT TTG AAA TGC GCC CAC GCT TAT TTG GAA AGC TCA CCT GAA GCG	SLIM Mutagenese ¹	pETM-10	<i>albA_136A</i>
LF071 (A1)	TAC TTA AAA GGG CTG AAC TCT AAC AAA TAT CAC CGG AAA AAC	SLIM Mutagenese ¹	pETM-10	<i>albA_C408A</i> <i>C414A C417A</i>
LF073 (B1)	TTT GTC TTT CAT GCA ATG TTC GCT GAA CCG C	SLIM Mutagenese ¹	pETM-10	<i>albA_C408A</i> <i>C414A C417A</i>
LF072 (B2)	GCC CCG TTC AGC GGC TAT GCC GGA GGC GCT TAC TTA AAA GGG CTG AAC TCT AAC AAA TAT CAC CGG AAA AAC	SLIM Mutagenese ¹	pETM-10	<i>albA_C408A</i> <i>C414A C417A</i>
LF074 (A2)	ACC GCC TCC GGC ATA GCC GCT GAA CGG GGC TTT GTC TTT CAT GCA ATG TTC GCT GAA CCG C	SLIM Mutagenese ¹	pETM-10	<i>albA_C408A</i> <i>C414A C417A</i>
LF088 (A1)	CTA GTG GAC GGT CCT ATC CCT GAT TTT G	SLIM Mutagenese ¹	pDG-148	<i>sboA_C4S,C7S,</i> <i>C13S,C13A²</i>
LF089 (B1)	ACC TTT GTT TTC TAC AAT GAC AGC TTT TTT C	SLIM Mutagenese ¹	pDG-148	<i>sboA_C4S,C7S,</i> <i>C13S,C13A²</i>
LF090 (A2)	ACA AGC GGC TCC GAT CGA GCA TGT TGC AGA ACC TTT GTT TTC TAC AAT GAC AGC TTT TTT C	SLIM Mutagenese ¹	pDG-148	<i>sboA_C4S</i>
LF091 (B2)	TCT GCA ACA TGC TCG ATC GGA GCC GCT TGT CTA GTG GAC GGT CCT ATC CCT GAT TTT G	SLIM Mutagenese ¹	pDG-148	<i>sboA_C4S</i>

Primername	Oligonukleotidsequenz	Restriktionsenzym	Vektor	Zielgen
LF092 (A2)	ACA AGC GGC TCC GAT CGA GGA TGT TGC ACA ACC TTT GTT TTC TAC AAT GAC AGC TTT TTT C	SLIM Mutagenese ¹	pDG-148	<i>sboA_C7S</i>
LF093 (B2)	TGT GCA ACA TCC TCG ATC GGA GCC GCT TGT CTA GTG GAC GGT CCT ATC CCT GAT TTT G	SLIM Mutagenese ¹	pDG-148	<i>sboA_C7S</i>
LF094 (A2)	AGA AGC GGC TCC GAT CGA GCA TGT TGC ACA ACC TTT GTT TTC TAC AAT GAC AGC TTT TTT C	SLIM Mutagenese ¹	pDG-148	<i>sboA_C13S</i>
LF095 (B2)	TGT GCA ACA TGC TCG ATC GGA GCC GCT TCT CTA GTG GAC GGT CCT ATC CCT GAT TTT G	SLIM Mutagenese ¹	pDG-148	<i>sboA_C13S</i>
LF104 (A2)	AGC AGC GGC TCC GAT CGA GCA TGT TGC ACA ACC TTT GTT TTC TAC AAT GAC AGC TTT TTT C	SLIM Mutagenese ¹	pDG-148	<i>sboA_C13A</i>
LF105 (B2)	TGT GCA ACA TGC TCG ATC GGA GCC GCT GCT CTA GTG GAC GGT CCT ATC CCT GAT TTT G	SLIM Mutagenese ¹	pDG-148	<i>sboA_C13A</i>
LF096 (A1)	GGT CTA TGG GGG TAA GCA TGC AAG C	SLIM Mutagenese ¹	pDG-148	<i>sboA_F22A, T28A, F31A, T28S, T28V, F22Y²</i>
LF097 (B1)	ATC AGG GAT AGG ACC GTC CAC TAG AC	SLIM Mutagenese ¹	pDG-148	<i>sboA_F22A, T28A, F31A, T28S, T28V, F22Y²</i>
LF098 (A2)	GAA TAG ACC TGT TGC ACC GGC AAT TTC AGC ATC AGG GAT AGG ACC GTC CAC TAG AC	SLIM Mutagenese ¹	pDG-148	<i>sboA_F22A</i>

Primernamen	Oligonukleotidsequenz	Restriktionsenzym	Vektor	Zielgen
LF099 (B2)	GCT GAA ATT GCC GGT GCA ACA GGT CTA TTC GGT CTA TGG GGG TAA GCA TGC AAG C	SLIM Mutagenese ¹	pDG-148	<i>sboA_F22A</i>
LF100 (A2)	GAA TAG ACC TGC TGC ACC GGC AAT TTC AAA ATC AGG GAT AGG ACC GTC CAC TAG AC	SLIM Mutagenese ¹	pDG-148	<i>sboA_T28A</i>
LF101 (B2)	TTT GAA ATT GCC GGT GCA GCA GGT CTA TTC GGT CTA TGG GGG TAA GCA TGC AAG C	SLIM Mutagenese ¹	pDG-148	<i>sboA_T28A</i>
LF102 (A2)	GGC TAG ACC TGT TGC ACC GGC AAT TTC AAA ATC AGG GAT AGG ACC GTC CAC TAG AC	SLIM Mutagenese ¹	pDG-148	<i>sboA_F31A</i>
LF103 (B2)	TTT GAA ATT GCC GGT GCA ACA GGT CTA GCC GGT CTA TGG GGG TAA GCA TGC AAG C	SLIM Mutagenese ¹	pDG-148	<i>sboA_F31A</i>
LF106 (A2)	GAA TAG ACC AGC TGC ACC GGC AAT TTC AAA ATC AGG GAT AGG ACC GTC CAC TAG AC	SLIM Mutagenese ¹	pDG-148	<i>sboA_T28S</i>
LF107 (B2)	TTT GAA ATT GCC GGT GCA GCT GGT CTA TTC GGT CTA TGG GGG TAA GCA TGC AAG C	SLIM Mutagenese ¹	pDG-148	<i>sboA_T28S</i>
LF108 (A2)	GAA TAG ACC GTC TGC ACC GGC AAT TTC AAA ATC AGG GAT AGG ACC GTC CAC TAG AC	SLIM Mutagenese ¹	pDG-148	<i>sboA_T28V</i>
LF109 (B2)	TTT GAA ATT GCC GGT GCA GAC GGT CTA TTC GGT CTA TGG GGG TAA GCA TGC AAG C	SLIM Mutagenese ¹	pDG-148	<i>sboA_T28V</i>

Primername	Oligonukleotidsequenz	Restriktionsenzym	Vektor	Zielgen
LF110 (A2)	GAA TAG ACC TGT TGC ACC GGC AAT TTC TAC ATC AGG GAT AGG ACC GTC CAC TAG AC	SLIM Mutagenese ¹	pDG-148	<i>sboA_F22Y</i>
LF110 (B2)	GTA GAA ATT GCC GGT GCA ACA GGT CTA TTC GGT CTA TGG GGG TAA GCA TGC AAG C	SLIM Mutagenese ¹	pDG-148	<i>sboA_F22Y</i>
LF007	CGG CTC CGA TCG AGC ATG TTG	<i>Round-the-Horn-</i> Mutagenese ^{1,3}	pDG-148	<i>sboA_C8A</i>
LF011	CT TGT CTA GTG GCA GGT CCT ATC CCT GAT TTT C	<i>Round-the-Horn-</i> Mutagenese ^{1,3}	pDG-148	<i>sboA_C8A</i>
LF051 (A1)	ATT TGT CAA CTG TAA GGT ACA ACT AAT AGG TAA ATA TGA ATC	SLIM Mutagenese ¹	pET-28a(+)	<i>skfB_C117A</i> <i>C121A C124A</i>
LF053 (B1)	GCC AGC TCA GGT AAA CCA TAT CCT GAG GAA TTA TC	SLIM Mutagenese ¹	pET-28a(+)	<i>skfB_C117A</i> <i>C121A C124A</i>
LF052 (B2)	ATA GGC AAA CGA AGC GCT TAA ATT AGC AGC ATT TGT CAA CTG TAA GGT ACA ACT AAT AGG	SLIM Mutagenese ¹	pET-28a(+)	<i>skfB_C117A</i> <i>C121A C124A</i>
LF054 (A2)	GCT GCT AAT TTA AGC GCT TCG TTT GCC TAT GCC AGC TCA GGT AAA CCA TAT CCT G	SLIM Mutagenese ¹	pET-28a(+)	<i>skfB_C117A</i> <i>C121A C124A</i>
LF116 (A1)	ATA GGG AAA ATT GAG CTA TCT GAA CCG GAC	SLIM Mutagenese ¹	pET-28a(+)	<i>skfB_C380A</i> <i>C385A C387A</i>
LF118 (B1)	TTT TAA CTG AAG CAA ACG AGC AGG TG	SLIM Mutagenese ¹	pET-28a(+)	<i>skfB_C380A</i> <i>C385A C387A</i>
LF117 (B2)	GCT GAA GCA AAA AAT GCT AAA GCC ATA GGG AAA ATT GAG CTA TCT GAA CCG GAC	SLIM Mutagenese ¹	pET-28a(+)	<i>skfB_C380A</i> <i>C385A C387A</i>

Primernamen	Oligonukleotidsequenz	Restriktionsenzym	Vektor	Zielgen
LF119 (A2)	GGC TTT AGC ATT TTT TGC TTC AGC TTT TAA CTG AAG CAA ACG AGC AGG TG	SLIM Mutagenese ¹	pET-28a(+)	<i>skfB_C380A</i> <i>C385A C387A</i>
Mo005 (A1)	ATG TCA TAT GAT CGT GTT AAA GAT TTT GAT TTG CCA G	SLIM Mutagenese ¹	pET-28a(+)	<i>skfB, skfB_C380A</i> <i>C385A C387A,</i> <i>skfB_C117A</i> <i>C121A C124A³</i>
Mo007 (B1)	ACC AGT CAT GCT AGC CAT ATG GCT GC	SLIM Mutagenese ¹	pET-28a(+)	<i>skfB, skfB_C380A</i> <i>C385A C387A,</i> <i>skfB_C117A</i> <i>C121A C124A³</i>
Mo006 (B2)	CTC GAG GTC CTC TTC CAG GGG CCT ATG TCA TAT GAT CGT GTT AAA GAT TTT GAT TTG CCA G	SLIM Mutagenese ¹	pET-28a(+)	<i>skfB, skfB_C380A</i> <i>C385A C387A,</i> <i>skfB_C117A</i> <i>C121A C124A²</i>
Mo008 (A2)	AGG CCC CTG GAA GAG GAC CTC GAG ACC AGT CAT GCT AGC CAT ATG GCT GC	SLIM Mutagenese ¹	pET-28a(+)	<i>skfB, skfB_C380A</i> <i>C385A C387A,</i> <i>skfB_C117A</i> <i>C121A C124A²</i>
LF079	TAT ATA GGT ACC TT ATG AAA AGA AAC CAA AAA GAA TGG GAA TCT GTG AGT AAA AAA G	KpnI	pET-48b(+)	<i>skfA</i>
LF044	TAT ATA CTC GAG TTA AAT AGC TCT CAT AGC AGG ATG CGG AAG	XhoI	pET-48b(+)	<i>skfA</i>
LF112 (A1)	AGC CGC GGA GTG ATG GTG ATG	SLIM Mutagenese ¹	pET-48b(+)	<i>skfA_TEV</i>
LF115 (B1)	ATG AAA AGA AAC CAA AAA GAA TGG GAA TCT GTG	SLIM Mutagenese ¹	pET-48b(+)	<i>skfA_TEV</i>
LF113 (A2)	GAG GAC TTG TAT TTT CAG TCT ATG AAA AGA AAC CAA AAA GAA TGG GAA TCT GTG	SLIM Mutagenese ¹	pET-48b(+)	<i>skfA_TEV</i>

Primername	Oligonukleotidsequenz	Restriktionsenzym	Vektor	Zielgen
LF114 (B2)	AGA CTG AAA ATA CAA GTC CTC AGC CGC GGA GTG ATG GTG ATG	SLIM Mutagenese ¹	pET-48b(+)	<i>skfA_TEV</i>
LF120 (A1)	ACA CGT GTT TGT GCA CTT CCG CAT C	SLIM Mutagenese ¹	pET-48b(+)	<i>skfA_TEV_C4S</i> , <i>C4A</i> , <i>M12A</i> , <i>M12S</i> , <i>M12T</i> , <i>M12N</i> , <i>M12F</i> <i>M12Y</i> , <i>M12</i> , <i>M12Q</i> <i>M12L</i> , <i>M12E</i> , <i>M12K</i> <i>C4M M12C</i> ²
LF121 (B1)	GCC CAT GCA GCC AGC AGC TTT C	SLIM Mutagenese ¹	pET-48b(+)	<i>skfA_TEV_C4S</i> , <i>C4A</i> , <i>M12A</i> , <i>M12S</i> <i>M12T</i> , <i>M12N</i> , <i>M12F</i> <i>M12Y</i> , <i>M12</i> , <i>M12Q</i> <i>M12L</i> , <i>M12E</i> , <i>M12K</i> <i>C4M M12C</i> ²
LF122 (A2)	CAT AGC AAT ACT CTT CGA GGC CCA AGA GCC CAT GCA GCC AGC AGC TTT C	SLIM Mutagenese ¹	pET-48b(+)	<i>skfA_TEV_C4S</i>
LF123 (B2)	TCT TGG GCC TCG AAG AGT ATT GCT ATG ACA CGT GTT TGT GCA CTT C	SLIM Mutagenese ¹	pET-48b(+)	<i>skfA_TEV_C4S</i>
LF124 (A2)	CAT AGC AAT ACT CTT CGA GGC CCA TGC GCC CAT GCA GCC AGC AGC TTT C	SLIM Mutagenese ¹	pET-48b(+)	<i>skfA_TEV_C4A</i>
LF125 (B2)	GCA TGG GCC TCG AAG AGT ATT GCT ATG ACA CGT GTT TGT GCA CTT C	SLIM Mutagenese ¹	pET-48b(+)	<i>skfA_TEV_C4A</i>
LF126 (A2)	ACA AGC AAT ACT CTT CGA GGC CCA CAT GCC CAT GCA GCC AGC AGC TTT C	SLIM Mutagenese ¹	pET-48b(+)	<i>skfA_TEV_C4M</i> <i>M12C</i>
LF127 (B2)	ATG TGG GCC TCG AAG AGT ATT GCT TGT ACA CGT GTT TGT GCA CTT C	SLIM Mutagenese ¹	pET-48b(+)	<i>skfA_TEV_C4M</i> <i>M12C</i>
LF128 (A2)	TGC AGC AAT ACT CTT CGA GGC CCA ACA GCC CAT GCA GCC AGC AGC TTT C	SLIM Mutagenese ¹	pET-48b(+)	<i>skfA_TEV_M12A</i>

MATERIALIEN

Primernamen	Oligonukleotidsequenz	Restriktionsenzym	Vektor	Zielgen
LF129 (B2)	TGT TGG GCC TCG AAG AGT ATT GCT GCA ACA CGT GTT TGT GCA CTT C	SLIM Mutagenese ¹	pET-48b(+)	<i>skfA_TEV_M12A</i>
LF130 (A2)	AGA AGC AAT ACT CTT CGA GGC CCA ACA GCC CAT GCA GCC AGC AGC TTT C	SLIM Mutagenese ¹	pET-48b(+)	<i>skfA_TEV_M12S</i>
LF131 (B2)	TGT TGG GCC TCG AAG AGT ATT GCT TCT ACA CGT GTT TGT GCA CTT C	SLIM Mutagenese ¹	pET-48b(+)	<i>skfA_TEV_M12S</i>
LF132 (A2)	TGT AGC AAT ACT CTT CGA GGC CCA ACA GCC CAT GCA GCC AGC AGC TTT C	SLIM Mutagenese ¹	pET-48b(+)	<i>skfA_TEV_M12T</i>
LF133 (B2)	TGT TGG GCC TCG AAG AGT ATT GCT ACA ACA CGT GTT TGT GCA CTT C	SLIM Mutagenese ¹	pET-48b(+)	<i>skfA_TEV_M12T</i>
LF134 (A2)	ATT AGC AAT ACT CTT CGA GGC CCA ACA GCC CAT GCA GCC AGC AGC TTT C	SLIM Mutagenese ¹	pET-48b(+)	<i>skfA_TEV_M12N</i>
LF135 (B2)	TGT TGG GCC TCG AAG AGT ATT GCT AAT ACA CGT GTT TGT GCA CTT C	SLIM Mutagenese ¹	pET-48b(+)	<i>skfA_TEV_M12N</i>
LF136 (A2)	ATA AGC AAT ACT CTT CGA GGC CCA ACA GCC CAT GCA GCC AGC AGC TTT C	SLIM Mutagenese ¹	pET-48b(+)	<i>skfA_TEV_M12Y</i>
LF137 (B2)	TGT TGG GCC TCG AAG AGT ATT GCT TAT ACA CGT GTT TGT GCA CTT C	SLIM Mutagenese ¹	pET-48b(+)	<i>skfA_TEV_M12Y</i>
LF138 (A2)	GAA AGC AAT ACT CTT CGA GGC CCA ACA GCC CAT GCA GCC AGC AGC TTT C	SLIM Mutagenese ¹	pET-48b(+)	<i>skfA_TEV_M12F</i>

Primername	Oligonukleotidsequenz	Restriktionsenzym	Vektor	Zielgen
LF139 (B2)	TGT TGG GCC TCG AAG AGT ATT GCT TTC ACA CGT GTT TGT GCA CTT C	SLIM Mutagenese ¹	pET-48b(+)	<i>skfA_TEV_M12F</i>
LF140 (A2)	TTG AGC AAT ACT CTT CGA GGC CCA ACA GCC CAT GCA GCC AGC AGC TTT C	SLIM Mutagenese ¹	pET-48b(+)	<i>skfA_TEV_M12Q</i>
LF141 (B2)	TGT TGG GCC TCG AAG AGT ATT GCT CAA ACA CGT GTT TGT GCA CTT C	SLIM Mutagenese ¹	pET-48b(+)	<i>skfA_TEV_M12K</i>
LF142 (A2)	TTT AGC AAT ACT CTT CGA GGC CCA ACA GCC CAT GCA GCC AGC AGC TTT C	SLIM Mutagenese ¹	pET-48b(+)	<i>skfA_TEV_M12K</i>
LF143 (B2)	TGT TGG GCC TCG AAG AGT ATT GCT AAA ACA CGT GTT TGT GCA CTT C	SLIM Mutagenese ¹	pET-48b(+)	<i>skfA_TEV_M12K</i>
LF144 (A2)	TTC AGC AAT ACT CTT CGA GGC CCA ACA GCC CAT GCA GCC AGC AGC TTT C	SLIM Mutagenese ¹	pET-48b(+)	<i>skfA_TEV_M12E</i>
LF145 (B2)	TGT TGG GCC TCG AAG AGT ATT GCT GAA ACA CGT GTT TGT GCA CTT C	SLIM Mutagenese ¹	pET-48b(+)	<i>skfA_TEV_M12E</i>
LF146 (A2)	TAA AGC AAT ACT CTT CGA GGC CCA ACA GCC CAT GCA GCC AGC AGC TTT C	SLIM Mutagenese ¹	pET-48b(+)	<i>skfA_TEV_M12L</i>
LF147 (B2)	TGT TGG GCC TCG AAG AGT ATT GCT TTA ACA CGT GTT TGT GCA CTT C	SLIM Mutagenese ¹	pET-48b(+)	<i>skfA_TEV_M12L</i>
Mo001 (A1)	GCA CTT CCG CAT CCT GCT ATG AGA G	SLIM Mutagenese ¹	pET-48b(+)	<i>skfA_TEV_C1S C16S</i>
Mo002 (B1)	GCC AGC AGC TTT CAC AAT CGA AGT ACC	SLIM Mutagenese ¹	pET-48b(+)	<i>skfA_TEV_C1S C16S</i>

Primernamen	Oligonukleotidsequenz	Restriktionsenzym	Vektor	Zielgen
Mo003 (A2)	AGA AAC ACG TGT CAT AGC AAT ACT CTT CGA GGC CCA ACA GCC CAT GGA GCC AGC AGC TTT CAC AAT CGA AGT ACC	SLIM Mutagenese ¹	pET-48b(+)	<i>skfA_TEV_C1S</i> <i>C16S</i>
Mo004 (B2)	TCC ATG GGC TGT TGG GCC TCG AAG AGT ATT GCT ATG ACA CGT GTT TCT GCA CTT CCG CAT CCT GCT ATG AGA G	SLIM Mutagenese ¹	pET-48b(+)	<i>skfA_TEV_C1S</i> <i>C16S</i>
LF082	ATA TAT GGA TCC ATG TCT AAT CAT AAT GTC CGT AAT GAA CCT GCC CAA TGT C	BamHI	pX	<i>lvn_cluster</i>
LF083	ATA TAT GGA TCC CTA ATT GCC GCT TTT AAC TGG AGC CAA AAT AG	BamHI	pX	<i>lvn_cluster</i>

¹Oligonukleotide die für die Mutagenese verwendet wurden besitzen keine Restriktionsenzymstimmstellen. ²Hierbei handelt es sich um die „kurzen“ SLIM-Mutagenese-Primer, die für verschiedene Konstrukte (getrennt durch ein „Komma“) verwendet worden sind. ³Oligonukleotide für die *Round-the-Horn*-Mutagenese waren am 5'-Ende phosphoryliert.

2.4 Vektoren

2.4.1 pDG148

Beim pDG148-Vektor (Stragier et al., 1988) handelt es sich um einen Shuttlevektor, der über die zwei Replikationsursprünge pBR322 und pUB110 verfügt und sich daher sowohl in *B. subtilis* wie auch in *E. coli* autonom repliziert. Der Vektor verfügt über drei Antibiotikaresistenzgene, von denen eins in *E. coli* (Ampicillin-Resistenz) und zwei in *B. subtilis* (Kanamycin- und Phleomycin- Resistenz) exprimiert werden und als Selektionsmarker verwendet werden können. Zur Klonierung der Zielkonstrukte wurden *E. coli* TOP10-Kulturen verwendet. In *B. subtilis* steht die Regulation des klonierten Gens unter Kontrolle des lac-Operators. Dessen Ex-

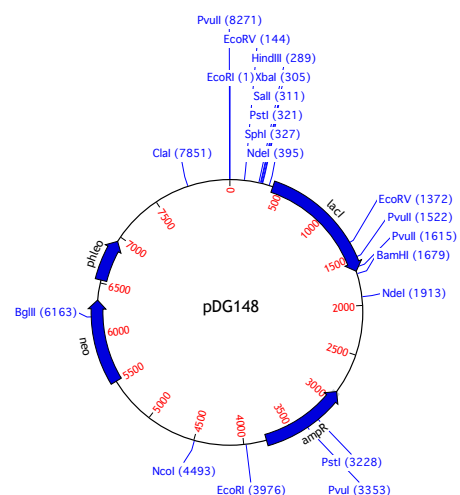


Abbildung 2.1: Physikalische Karte des pDG148-Shuttlevektors.

pression kann daher durch Zugabe von IPTG induziert werden. Der pDG148-Vektor wurde zur homologen Expression von Subtilisin A-Varianten verwendet. Als Expressionsstamm wurde *B. subtilis* 168 verwendet.

2.4.2 pET-28a(+)

Der Expressionvektor pET-28a(+) (Novagen) ermöglicht die Expression von rekombinanten Proteinen mit N- und C-terminalen His-Tag. Das klonierte Gen steht unter der Kontrolle des lac-Operators und des T7-Promoters. In *E. coli*-Stämmen, die über die T7-RNA-Polymerase verfügen, kann daher die Expression des Gens unter Zugabe von IPTG induziert werden. Des Weiteren verfügt der Vektor über das Kanamycinresistenzgen *kanR*, weshalb Kanamycin als Selektionsmarker verwendet werden. Der pET-28a(+)-Vektor wurde zur Expression des Radical SAM Enzyms SkfB verwendet. Als Expressionsstamm wurde *E. coli* BL21 (DE3) verwendet.

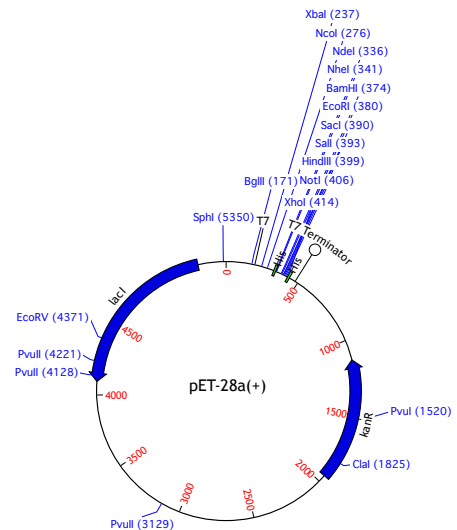


Abbildung 2.2: Physikalische Karte des pET-28a(+) Expressionsvektors.

2.4.3 pET-48b(+)

Der Expressionsvektor pET-48b(+) (Novagen) ermöglicht die Expression von rekombinanten Proteinen als Thioredoxin-Fusion. Der N-terminale Thioredoxinrest kann zur Erhöhung der Löslichkeit heterolog exprimierter Proteine führen (LaVallie et al., 1993; Stoll et al., 1998; Wilkinson et al., 1995). Zusätzlich eignet er sich besonders für die Expression von kleinen Proteinen und Peptiden, die wegen ihrer nicht vorhandenen Sekundärstruktur natürlicherweise proteaselabil sind. Durch den fusionierten Thioredoxinrest werden sie vor proteolytischem Abbau geschützt. Des Weiteren verfügen die rekombinat hergestellten Proteine über einen His-Tag, können also per Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Als Selektionsmarker kann Kanamycin verwendet werden, da der Vektor über das Kanamycinresistenzgen *kanR* verfügt. Der pET-48b(+)-Vektor wurde zur

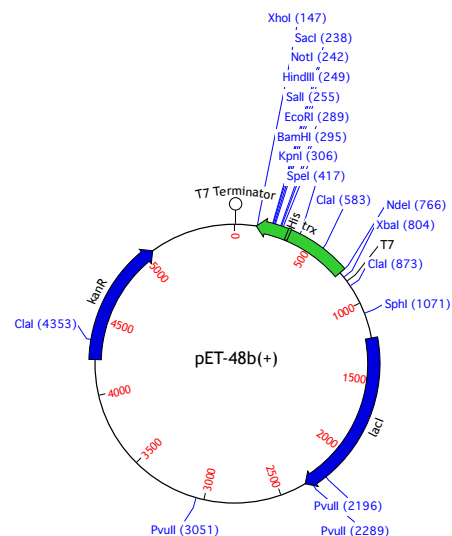


Abbildung 2.3: Physikalische Karte des pET-48b(+) Expressionsvektors.

2.5 Mikroorganismen

2.5.1 *Bacillus subtilis* 168

Bei *Bacillus subtilis* 168 handelt es sich um ein begeißeltes Gram-positives Bakterium, das den Genotyp *trpC2 sfp*⁰ besitzt und daher Tryptophan auxotroph ist. Es ist der natürliche Produzent von Subtilosin A und dem Sporulation Killing Factor. In dieser Arbeit wurde es zur Extraktion chromosomaler DNA und zur Naturstoffextraktion homolog produzierter Subtilosin A-Varianten kultiviert.

2.5.2 *Escherichia coli* BL21 (DE3)

Der *E. coli* BL21 (DE3)-Stamm mit dem Genotyp *F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) λ(DE3)* wurde zur heterologen Expression von rekombinanten Proteinen verwendet. Die Halbwertszeit der exprimierten Proteine wird durch den Gen-Knockout der Lon- und OmpT-Protease erhöht, wodurch höhere Proteinausbeuten ermöglicht werden. Darüberhinaus verfügt der Stamm über eine Insertion innerhalb des *int*-Gens, die den *lacUV5*-Promoter, das *lacI*-Gen und das Gen für die T7 RNA-Polymerase trägt. Dadurch ist es erst möglich, die Expression von plasmidkodierten Genen, die unter Kontrolle eines T7-Promoters stehen, unter Zugabe von IPTG zu induzieren.

2.5.3 *Escherichia coli* TOP10

Der *E. coli* TOP10-Stamm besitzt den Genotyp *F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galk rpsL(Str^R) endA1 nupG λ⁻* und wurde für Klonierungszwecke entwickelt. Zusätzlich zu dieser Funktion wurde er auch zur Amplifikation von Plasmid-DNA für die Sequenzierung verwendet.

2.5.4 *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* BRL-230010

Bei *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* BRL-230010 handelt es sich um ein begeißeltes Gram-positives Bakterium (Qin et al., 2006). Obwohl es als S1-Organismus deklariert ist, besitzt es eine hohe Pathogenität gegen Bienen und ist der Verursacher der amerikanischen Faulbrut (Brodsgaard et al., 1998). Es besitzt einen Gencluster, der eine hohe Homologie zum *skf*-Operon von *B. subtilis* 168 aufweist.

2.6 Kulturmedien

2.6.1 LB-Medium

Das *lysogeny-broth* (LB) Medium (Bertani, 1951) wurde für die Kultivierung aller in dieser Arbeit verwendeten *B. subtilis* wie auch *E. coli*-Spezies verwendet. Eine genaue Zusammensetzung findet sich in Tabelle 2.4.

Tabelle 2.4: Zusammensetzung des verwendeten LB-Mediums. Der pH-Wert wurde auf pH 7 eingestellt. Für die Herstellung von Agarplatten wurden 1.5% (w/v) Agar No.1 hinzugefügt.

Komponente	Konzentration
Hefeextrakt	5 g/L
Bactotrypton	10 g/L
Natriumchlorid	5 g/L

2.6.2 HS- und LS-Medium

Das HS- und LS-Medium wurde verwendet um kompetente *Bacillus subtilis* 168-Spezies zu generieren. Die Zusammensetzungen der Medien sind in Tabelle 2.5 bis 2.7 zusammengefasst.

Tabelle 2.5: Zusammensetzung von 100 mL HS-Medium.

Komponente	Volumen
10x S-Base	10 mL
50% (w/v) Glucose	1 mL
10% (w/v) Hefeextrakt	1 mL
2% (w/v) Caseinhydrolysat	1 mL
8% (w/v) Arginin	10 mL
0.4% (w/v) Histidin	10 mL
0.5% (w/v) Tryptophan	1 mL
<i>ddH₂O</i>	ad 100 mL

Tabelle 2.6: Zusammensetzung der 10x S-Base.

Komponente	Konzentration
$(\text{NH}_4)\text{SO}_4$	20 g/L
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$	140 g/L
KH_2PO_4	60 g/L
Trinatriumcitrat $\cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	10 g/L
MgSO_4	0.12 g/L

Tabelle 2.7: Zusammensetzung von 100 mL LS-Medium.

Komponente	Volumen
10x S-Base	10 mL
50% (w/v) Glucose	1 mL
10% (w/v) Hefeextrakt	1 mL
2% (w/v) Caseinhydrolysat	0.5 mL
50 mM Spermin	1 mL
1 M MgCl_2	0.25 mL
0.5% (w/v) Tryptophan	1 mL
<i>ddH</i> ₂ O	ad 100 mL

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Präparation chromosomaler DNA aus *B. subtilis* 168

Für die Präparation chromosomaler DNA wurden zunächst 4 mL einer *B. subtilis* 168-Übernachtskultur (LB-Medium) durch Zentrifugation (5 min; 13200 rpm; RT) pelletiert. Das erhaltene Zellpellet wurde mit 1 mL *ddH*₂O gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 500 μ L Lyse-puffer [100 mM Tris/HCl; 50 mM EDTA; 1% (w/v) SDS; pH 8.0] resuspendiert. Es wurden bis zu einem Volumen von 1.25 mL in Säure gewaschene Glasperlen hinzugefügt und für 2 min vortexiert. Anschließend wurde die flüssige Phase in ein neues 1.5 mL-Reaktionsgefäß überführt und mit 275 μ L einer 7 M Ammoniumacetatlösung [pH 7.0] versetzt. Die erhaltene Suspension wurde 5 min bei RT und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 500 μ L Chloroform und es wurde für 30 s vortexiert. Nach erneuter Zentrifugation (5 min; 13200 rpm; RT) trennten sich organische- und wässrige-Phase. Die wässrige-Phase (oben) wurde in ein neues 1.5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 1 mL Isopropanol wurde die Lösung 5 min bei RT inkubiert und anschließend zentrifugiert (5 min; 13200 rpm; RT), wobei sich ein Pellet aus chromosomaler DNA bildete. Der Überstand wurde daher verworfen und das Pellet mit 70% aq Ethanol (100 μ L) gewaschen, getrocknet und abschließend in 50 μ L *ddH*₂O gelöst. Die Lagerung der Lösung erfolgte bei – 26 °C.

3.1.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Plasmidpräparation wurden zunächst 5 mL LB-Medium (versetzt mit zu dem verwendeten Plasmid passendem Antibiotikum) mit einer *E. coli*-Einzelkolonie inokuliert und über Nacht inkubiert (37 °C; 220 rpm). Anschließend wurden 4 mL der ÜNK in einem 2 mL-Reaktionsgefäß durch Zentrifugation (5 min; 13200 rpm; RT) pelletiert.

3.1.2.1 *Quick and Dirty* Plasmidpräparation

Für die *Quick and Dirty*-Plasmidpräparation (Birnboim and Doly, 1979) wurde das erhaltende Zellpellet in 300 μ L Puffer P1 [50 mM Tris/HCl; 10 mM EDTA; 100 μ g/mL RNase A; pH 8.0] resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 300 μ L Puffer P2 [200 mM NaOH; 1% (w/v) SDS]. Die Komponenten wurden durch kurzes invertieren des Reaktionsgefäßes gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 300 μ L Puffer P3 [2.55 M KOAc; pH 4.8]. Die Komponenten wurden erneut durch mehrmaliges Invertieren des Reaktionsgefäßes gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation

(10 min; 13200 rpm; RT) wurde der Überstand in ein 1.5 mL-Reaktionsgefäß überführt, mit 600 μ L Isopropanol versetzt und es wurde erneut zentrifugiert (30 min; 13200 rpm; 4 °C). Dabei bildete sich ein Pellet aus Plasmid-DNA, das, nachdem der Überstand verworfen wurde, mit 70% aq. Ethanol gewaschen, bei 37 °C getrocknet und in 50 μ L EB-Puffer [10 mM Tris/HCl; pH 8.0] gelöst wurde. Die Lagerung der Lösung erfolgte bei -26 °C.

3.1.2.2 GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit

Das GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) wurde verwendet um Plasmid-DNA hoher Reinheit für z. B. die Sequenzierung zu gewinnen. Hierbei wurde das Zellpellet laut den Herstellerangaben verarbeitet. Die Lagerung der erhaltenen DNA-Lösung erfolgte bei -26 °C.

3.1.3 Herstellung von Expressionskonstrukten

Die Herstellung von Expressionskonstrukten erfolgte nach molekularbiologischen Standardmethoden (Maniatis et al., 1989). Im ersten Schritt erfolgte die Amplifikation der zu klonierenden Gene mittels PCR unter Verwendung der Phusion-Polymerase (New England Biolabs) nach Herstellerangaben. Im zweiten Schritt erfolgte die Reinigung der PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese und unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen). Die gereinigten DNA-Amplifikate wurden anschließend mit Hilfe von Restriktionsenzymen laut Herstellerangaben (New England Biolabs) verdaut und erneut gereinigt. Die geschnittenen DNA-Fragmente wurden mit den linearisierten Vektoren nach Herstellerangaben (New England Biolabs) ligiert. Anschließend wurden elektrokompetente *E. coli* TOP 10-Zellen mit dem dialysierten Ligationsansätzen bei 2.5 kV transformiert, für 1 h bei 37 °C inkubiert und auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Die LB-Agarplatten waren mit dem für die Selektion benötigten Antibiotikum versetzt. Im nächsten Schritt wurden die Plasmide präpariert (Kapitel 3.1.2) und sequenziert (GATC Biotech). Für die Expression wurden elektrokompetente *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen mit Plasmiden mit korrekter Basenabfolge bei 2.5 kV transformiert.

3.1.4 Mutagenese

Mutationen wurden entweder über die *site-directed ligase independent mutagenesis* (SLIM, Abbildung 3.1) (Chiu et al., 2004; 2008) oder die *round-the-horn site directed mutagenesis*-Methode (Hemsley et al., 1989) in eine DNA-Sequenz eingeführt. Für die für beide Mutagenesevarianten benötigte PCR wurde jeweils die Phusion-Polymerase (New England Biolabs) mit GC-Puffer verwendet. Der DMSO-Anteil der Reaktionslösung betrug entweder 5% oder 10%.

3.1.4.1 SLIM-Mutagenese

Ein großer Vorteil der SLIM-Mutagenese gegenüber der *round-the-horn site directed mutagenesis* ist neben der Tatsache, dass keine Ligation durchgeführt werden muss, die hohe Ausbeute an richtigem Konstrukt. Für die SLIM-Methode werden zwei Primerpaare benötigt. Die beiden *Forward*- und beiden *Reverse*-Primer besitzen jeweils die gleiche *Annealing*-Sequenz, unterscheiden sich aber in ihrem 5'-Überhang. So trägt jeweils ein *Reverse*- und ein *Forward*-Primer einen komplementären 5'-Überhang aus mindestens 18 Basenpaaren, in dem sich die Mutationen befinden.

Da für die SLIM-Methode zwei Primerpaare verwendet werden, wurden für eine Mutagenese jeweils zwei PCRs angesetzt. Die PCR-Produkte wurden mittels des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) gereinigt und anschließend mit dem Restriktionsenzym DpnI nach Herstellerangaben (New England Biolabs) verdaut, um die methylierte Plasmid-DNA, die als Templat der PCR diente, zu entfernen. Anschließend wurde die sogenannte Hybridisierungsreaktion durchgeführt. Dafür wurden jeweils 10 μ L der DpnI-Reaktionslösungen mit 10 μ L Hybridisierungspuffer [125 mM Tris/HCl; 750 mM NaCl; 100 mM EDTA; pH = 8.0] und 20 μ L *ddH*₂O zusammen gegeben. Die erhaltende Lösung wurde unter folgenden PCR-ähnlichen Bedingungen behandelt: 3 min 99 °C initiale Denaturierung; 5 min 65 °C; 40 min 30 °C; die letzten beiden Schritte wurden dreimal wiederholt. Im Anschluss wurden 10 μ L der Reaktionslösung dialysiert und mit elektrokompenten *E. coli* TOP 10-Zellen bei 2.5 kV transformiert. Nach erfolgreicher Selektion auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten wurden die Plasmide präpariert (Kapitel 3.1.2) und sequenziert (GATC). Für die Expression wurden elektrokompente *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen mit Plasmiden mit korrekter Basenabfolge bei 2.5 kV transformiert. Ein schematischer Ablauf der SLIM-Mutagenese findet sich in Abbildung 3.1.

3.1.4.2 *Round-the-horn site-directed* Mutagenese

Für die *round-the-horn site-directed* Mutagenese werden zwei Primer verwendet, die, die als Templat verwendete Plasmid-DNA nach erfolgreicher PCR linearisieren. Die verwendeten am 5'-Ende phosphorylierten Oligonukleotide sind komplementär zur mutierenden DNA-Sequenz, tragen aber bereits die Mutationen innerhalb ihrer Sequenz. Wichtig ist, dass sie untereinander keine überlagernden Sequenzen besitzen.

Wie bei der SLIM-Mutagenese wurde nach erfolgreicher PCR das Produkt mittels des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) gereinigt und einem DpnI-Verdau (New England Biolabs) unterzogen. Die Reaktionslösung wurde im Anschluss mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen) gereinigt und die erhaltene linearisierte DNA mittels der T4 DNA-Ligase (New England

Biolabs) nach Herstellerangaben intramolekular ligiert. Anschließend wurde, wie unter Kapitel 3.1.4.1 beschrieben, mit der Transformation und der Plasmidverifizierung weiter verfahren.

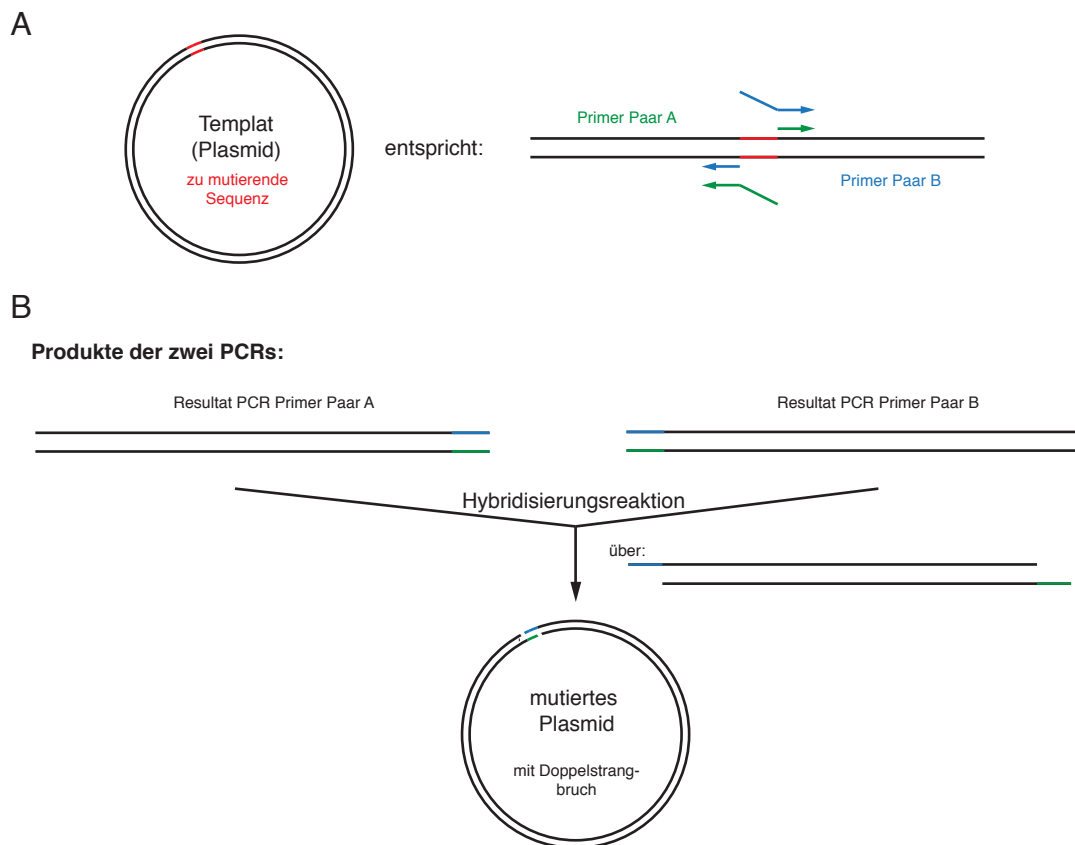


Abbildung 3.1: Schematischer Aufbau und Ablauf der SLIM-Methode. (A) Für die SLIM-Methode müssen zwei verschiedene Primerpaare (A und B) in zwei verschiedenen PCRs eingesetzt werden. Die Überhänger des blauen und grünen „langen“ Primers sind komplementär. (B) Produkte der beiden PCRs und schematische Darstellung der anschließenden Hybridisierungsreaktion. Das erhaltene Plasmid mit Doppelstrangbruch kann direkt transformiert werden.

3.1.5 Chemische Transformation von *B. subtilis* 168

Die chemische Transformation von *B. subtilis* 168 wurde nach einer modifizierten Zweistufenmethode von Klein *et al.* durchgeführt (Klein *et al.*, 1992). Das Protokoll beruht auf der Tatsache, dass *B. subtilis*-Zellen beim Eintreten in die stationäre Wachstumsphase eine natürliche Kompetenz ausbilden. Es wurden zunächst 3 mL HS-Medium (siehe Tabelle 2.5) mit einer *B. subtilis* LB-Vorkultur zu einer OD_{600} von 0.1 inokuliert und bis zu einer OD_{600} von 3.0 – 4.0 bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Mit dieser HS-Übertagkultur wurden 20 mL LS-Medium (siehe Tabelle 2.7) zu einer OD_{600} von 0.05 inokuliert und bis zu einer OD_{600} von 0.5 bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. 1 mL der LS-Kultur wurden in ein 2 mL-Reaktionsgefäß überführt und mit ca. 250 µg zu transformierender Plasmid-DNA versetzt. Die Suspension wurde weitere 2 h bei 37 °C

und 250 rpm inkubiert. Anschließend wurde die vollständige Kultur auf LB-Agarplatten, die zur Selektion mit dem jeweiligen Antibiotikum versetzt waren, ausgestrichen. Entstandene Einzelkolonien wurden zur Fermentation von Subtilosin A-Varianten verwendet (Kapitel 3.2.2.5).

3.1.6 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter Zellen wurden zunächst zweimal 300 mL LB-Medium mit einer *E. coli*-Übernachtskultur zu einer OD₆₀₀ von 0.1 im Abstand von 45 min inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 – 0.6 bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Die Kulturen wurden in sechs Portionen gleichen Volumens geteilt und zentrifugiert (25 min; 4000 rpm; 4 °C). Die erhaltenen Pellets wurden zweimal mit je 40 mL kalten, sterilen ddH₂O gewaschen, d. h. resuspendiert und erneut zentrifugiert (25 min; 4000 rpm; 4 °C). Im Anschluss wurden die Pellets mit je 1 mL kalten, sterilen ddH₂O gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min; 13200 rpm; 4 °C). Der Vorgang wurde mit je 500 µL einer kalten und sterilen 10%igen Glycerinlösung wiederholt. Abschließend wurden die Zellpellets in je 200 µL kalter, steriler 10%iger Glycerinlösung resuspendiert, in Aliquote à 40 µL aufgeteilt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.2 Proteinchemische Methoden

Die Standardtechniken der Proteinanalytik, wie z. B. die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, wurden nach Protokollen von *Bennett et al.* und *Laemmli* durchgeführt (Bennett and Scott, 1971; Laemmli, 1970).

3.2.1 Fermentation von *B. subtilis* 168 zur Produktion von Subtilosin A

Die Herstellung von Subtilosin A wurde nach einem Protokoll von *Michael Gattner* durchgeführt (Gattner, 2010). Dafür wurden 300 mL LB-Medium mit einer *B. subtilis* 168-Vorkultur zu einer OD₆₀₀ von 0.1, in einem Schikane-freien 1 L-Kulturkolben, inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6 inkubiert (37 °C; 220 rpm). Anschließend wurde die Schüttlergeschwindigkeit auf 100 rpm reduziert und es wurde für weitere 18 h inkubiert. Die Zellen wurden zentrifugiert (30 min; 6000 rpm; 4 °C) und der Überstand weiterverarbeitet (Kapitel 3.3.2).

3.2.2 Hetero- und Homologe Genexpression

3.2.2.1 Expression von *albA* und *albA*-Mutanten im pETM-10-Vektor

Die Expression des Radical SAM Enzyms AlbA wurde wie folgt durchgeführt: Zunächst wurden 500 mL LB-Medium [50 µg/mL Kanamycin; Kan50] in einem 2 L-Kulturkolben mit Schikane mit 5 mL einer *E. coli* BL21 (DE3) pETM-10 *albA*-Übernachtskultur inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6 inkubiert (37 °C; 220 rpm). Zur Induktion der Expression wurde IPTG bis zu einer End-

konzentration von 0.2 mM hinzugegeben und die Temperatur auf 18 °C reduziert. Es wurde über Nacht inkubiert und anschließend zentrifugiert (30 min; 6000 rpm; 4 °C). Das Zellpellet wurde in Puffer TrisA [25 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; pH = 8.0] resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Expression der AlbA-Mutanten erfolgte nach dem gleichen Protokoll.

3.2.2.2 Expression von *skfB* und *skfB*-Mutanten im pET-28a(+) Vektor

Für die Expression des Radical SAM Enzyms SkfB wurden 500 mL LB-Medium [50 µg/mL Kanamycin; Kan50] in einem 2 L-Kulturkolben mit Schikane mit einer *E. coli* BL21 (DE3) pET-28a(+) *skfB*-Vorkultur im Verhältnis 1:100 inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6 inkubiert (37 °C; 220 rpm). Anschließend wurde die Temperatur auf 24 °C reduziert und die Expression durch die Zugabe von IPTG [Endkonzentration 0.5 mM] induziert. Die Kultur wurde über Nacht inkubiert und danach zentrifugiert (30 min; 6000 rpm; 4 °C). Das erhaltene Zellpellet wurde in Puffer TrisA [25 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; pH = 8.0] resuspendiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert. Die SkfB-Mutanten wurden nach dem gleichen Verfahren exprimiert.

3.2.2.3 Expression von *skfA* als Thioredoxin-fusionsprotein im pET-48b(+)-Vektor

Zur Expression des Thioredoxin-SkfA-Fusionsproteins (Trx-SkfA) mit TEV-Schnittstelle wurden 500 mL LB-Medium [50 µg/mL Kanamycin; Kan50] in einem 2 L-Kulturkolben mit Schikane mit 5 mL einer *E. coli* BL21 (DE3) pET-48b(+) *skfA* TEV-Vorkultur inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6 inkubiert (37°C; 220 rpm). Anschließend wurde die Temperatur auf 18 °C reduziert und die Expression des Proteins durch die Zugabe von IPTG [Endkonzentration 0.2 mM] induziert. Die Kultur wurde über Nacht inkubiert und im Anschluss zentrifugiert (30 min; 6000 rpm; 4 °C). Das erhaltene Zellpellet wurde in Puffer TrisA [25 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; pH = 8.0], der zusätzlich einen Proteaseinhibitorcocktail (Sigma-Aldrich) enthielt, resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Trx-SkfA-Varianten wurden nach dem gleichen Protokoll exprimiert.

3.2.2.4 Expression der TEV-Protease

Für die Expression der TEV-Protease wurde das pRK793-Plasmid (Kapust et al., 2001) verwendet. Dazu wurden zunächst 500 mL LB-Medium [100 mg/mL Ampicillin; Amp100] in einem 2 L-Kulturkolben mit Schikane im Verhältnis 1:100 mit einer *E. coli* BL21 (DE3) pRK793-Übernachtskultur inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6 inkubiert (37 °C; 220 rpm). Die Expression wurde durch Zugabe von IPTG [Endkonzentration 0.2 mM] induziert und die Temperatur auf 20 °C reduziert. Es wurde über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Kultur zentrifu-

giert (30 min; 6000 rpm; 4 °C) und das erhaltene Zellpellet in Puffer TevA [20 mM Hepes/HCl; 150 mM NaCl; 5% Glycerol; 2 mM b-Mercaptoethanol; pH = 7.5] resuspendiert. Die Suspension wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.2.2.5 Homologe Produktion von Subtilisin A-Varianten in *B. subtilis* 168

Zur homologen Produktion der Subtilisin A-Varianten wurden Mutanten des pDG148 *sboA*-Plasmids (Gattner, 2010) verwendet. Es wurden zunächst 300 mL LB-Medium [5 µg/mL Kanamycin; Kan5] in einem Schikane-freien 1 L-Kulturkolben mit 3 mL einer *B. subtilis* 168 pDG148 *sboA*_{Variante}-Vorkultur inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6 inkubiert (37 °C; 220 rpm). Zur Induktion der Expression des mutierten Subtilisin A Vorläuferpeptids wurde IPTG [Endkonzentration 1 mM] hinzugegeben und die Schüttlergeschwindigkeit auf 100 rpm reduziert. Es wurde über Nacht inkubiert und anschließend zentrifugiert (30 min; 6000 rpm; 4 °C). Im Anschluss wurde aus dem Überstand und aus dem Pellet die jeweilige Subtilisin A-Variante extrahiert (Kapitel 3.3.1 und 3.3.2).

3.2.3 Zellaufschluss

Zum Zellaufschluss wurde die eingefrorene Zellsuspension aufgetaut und mit Hilfe einer French Press (SLM Aminco) aufgeschlossen. Je nach Konsistenz wurden die Zellen ein- bis dreimal durch die gekühlte Standard Cell 40 KP (Thermo) gepresst. Anschließend wurde zentrifugiert (30 min; 17000 rpm; 4 °C) um die löslichen Proteine von unlöslichen Zellbestandteilen zu trennen. Der erhaltene Überstand wurde filtriert (0.45 µm Porengröße) und zur nachfolgenden Proteinreinigung verwendet.

3.2.3.1 Zellaufschluss von SkfB für die Kristallisation

Für die Kristallisation wurde der Zellaufschluss in anaeroben Bedingungen durchgeführt. Das beinhaltete, dass die Zellsuspension unter anaeroben Bedingungen in die Standard Cell 40 KP (Thermo) gefüllt wurde und das Zelllysate direkt in eine, mit Septum verschlossene, anaerobe Flasche gepresst wurde. Für die anschließende Zentrifugation mittels einer Ultrazentrifuge (60 min; 40000 rpm; 4 °C) wurden luftdichte Zentrifugationsröhrchen verwendet, die ebenfalls unter anaeroben Bedingungen befüllt wurden.

3.2.4 Proteinreinigung

Alle Proteinreinigungen - soweit nichts anderes vermerkt ist - wurden entweder mit Hilfe eines FPLC-Systems 250 (Amersham Pharmacia) oder eines Äkta Purifiers 900 (GE) durchgeführt.

3.2.4.1 Reinigung des Radical SAM Enzyms AlbA und der AlbA-Mutanten

Die Reinigung von AlbA erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurde eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie durchgeführt. Nach erfolgreicher Rekonstitution der Fe/S-Cluster (Kapitel 3.2.5) erfolgte die Entsalzung mittels HiPrep 26/10 *Desalting*-Säule (GE Healthcare) oder 10DG *Desalting*-Säule (BIO RAD).

Das rekombinant hergestellte AlbA verfügte über einen N-terminalen His(6)-Tag, konnte daher per Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Dazu wurde zunächst eine Ni-NTA-Säule mit Puffer TrisA [25 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; pH = 8.0] mit einer Flussrate von 1 mL/min äquilibriert. Anschließend wurde der Überstand des Zelllysats (Kapitel 3.2.3) mit einer Flussrate von 0.7 mL/min auf die Säule aufgetragen. Es wurde solange mit 5% TrisB [25 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 250 mM Imidazol; pH = 8.0] gewaschen, bis kein Protein mehr von der Säule eluierte. Danach wurde das in Tabelle 3.1 zusammengefasste Elutionsprogramm ausgeführt. Die Flussrate betrug weiterhin 0.7 mL/min, die Fraktionsgröße betrug jeweils 1.4 mL.

Tabelle 3.1: Elutionsprogramm der Ni-NTA-Affinitätschromatographie des Radical SAM Enzyms AlbA.

Zeit	Konzentration TrisB
0 min	5%
45 min	50%
65 min	100%

Die Protein-chemische Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE untersucht. Fraktionen hoher Reinheit wurden vereinigt und mit Hilfe eines Amicon-Ultra-15-Konzentrators (Ausschlussmasse 30 kDa) konzentriert. Im Anschluss wurde das Protein rekonstituiert (Kapitel 3.2.5). Die abschließende Reinigung per Entsalzungssäule wurde entweder unter aeroben Bedingungen an der FPLC mittels HiPrep 26/10 *Desalting*-Säule (GE Healthcare) oder unter anaeroben Bedingungen mittels 10DG *gravity flow Desalting*-Säule (BIO RAD) durchgeführt. Als Laufmittel wurde jeweils Recon Puffer [25 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 10 mM DTT; pH = 8.0] verwendet. Die Protein-haltigen Fraktionen wurden vereinigt, ggf. per Amicon-Ultra-15-Konzentrator (Ausschlussmasse 30 kDa) konzentriert, in flüssigem Stickstoff in Aliquote à 200 µL schockgefroren und bei -80 °C zur weiteren Verarbeitung gelagert. Die Reinigung der generierten AlbA-Mutanten erfolgte nach dem gleichen Protokoll.

3.2.4.2 Reinigung des Radical SAM Enzyms SkfB und der SkfB-Mutanten

Die Reinigung von SkfB erfolgte, wie auch die Reinigung von AlbA, in zwei Schritten. Zunächst wurde eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie durchgeführt. Anschließend wurde das Protein mit Eisen und Schwefel beladen und abschließend per Gelfiltrationschromatographie mit *Desalting*-Säulen entsalzt.

Rekombinant hergestelltes SkfB verfügte, wie auch AlbA, über einen N-terminalen His(6)-Tag, konnte also per Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Dazu wurde zunächst eine Ni-NTA-Affinitätsäule mit Puffer TrisA [25 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; pH = 8.0] mit einer Flussrate von 1 mL/min äquilibriert. Anschließend wurde der Überstand des Zelllysats (Kapitel 3.2.3) mit einer Flussrate von 0.7 mL/min auf die Säule aufgetragen und solange mit 10% TrisB [25 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 250 mM Imidazol; pH = 8.0] mit einer Flussrate von 0.7 mL/min gespült, bis kein Protein mehr von der Säule eluierte. Danach wurde das in Tabelle 3.2 beschriebene Programm durchgeführt. Die Flussrate betrug weiterhin 0.7 mL/min und die Fraktionsgröße 1.4 mL.

Tabelle 3.2: Elutionsprogramm der Ni-NTA-Affinitätschromatographie des Radical SAM Enzyms SkfB.

Zeit	Konzentration TrisB
0 min	10%
45 min	50%
65 min	100%

Die Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE untersucht. Fraktionen hoher Reinheit wurden vereinigt und für die anschließende Rekonstitution (Kapitel 3.2.5) mittels Amicon-Ultra-15-Konzentratoren (Ausschlussmasse 30 kDa) konzentriert. Nach erfolgreicher Rekonstitution wurde die Proteinlösung mit Hilfe von *Desalting*-Säulen entsalzt, um überschüssiges Eisen und Schwefel zu entfernen. Die Entsalzung wurde entweder unter aeroben Bedingungen mittels einer HiPrep 26/10 *Desalting*-Säule (GE Healthcare) oder unter anaeroben Bedingungen mittels 10DG *gravity flow Desalting*-Säule (BIO RAD) durchgeführt. Als Laufmittel wurde in beiden Fällen Recon Puffer [25 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 10 mM DTT; pH = 8.0] eingesetzt. Protein-haltige Fraktionen wurden vereinigt, ggf. per Amicon-Ultra-15-Konzentrator (Ausschlussmasse 30 kDa) konzentriert, in flüssigem Stickstoff in Aliquote à 200 µL schockgefroren und zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Reinigung der rekombinant hergestellten SkfB-Mutanten erfolgte nach dem gleichen Protokoll.

3.2.4.2.1 Reinigung von SkfB für die Kristallisation

Für die Kristallisation wurde SkfB unter streng anaeroben Bedingungen in einem Stickstoffzelt (Coy) gereinigt. Dafür wurde der Überstand des Zelllysats, das unter anaeroben Bedingungen aufgeschlossen wurde (Kapitel 3.2.3.1), auf eine mit anaerobisiertem Puffer TrisA [25 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; pH = 8.0] äquilibrierte *gravity flow* Ni-NTA-Affinitätssäule aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit zehn Säulenvolumen anaerobisiertem 10%igen Puffer TrisB [25 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 250 mM Imidazol; pH = 8.0] gespült. Die Elution von SkfB erfolgte mit zehn Säulenvolumen Puffer TrisB. Die Protein-haltigen Fraktionen besaßen eine so hohe Konzentration an SkfB, dass die Rekonstitution (Kapitel 3.2.5) ohne vorherige Konzentrierung durchgeführt werden konnte. Anschließend wurden überschüssige Eisen- und Schwefelreste mittels 10DG *gravity flow* Desalting-Säule entfernt und die erhaltene rekonstituierte Proteinlösung wurde abschließend per Gelfiltrationschromatographie gereinigt. Dazu wurde eine HiLoad 16/60 Superdex 200-Säule (GE Healthcare) mit anaerobisierten Puffer TrisA als Laufmittel verwendet. Die Protein-chemische Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE analysiert. Fraktionen hoher Reinheit wurden vereinigt und für die anschließende Kristallisation konzentriert. Dafür wurde ein Amicon Membrankonzentrator (Ausschlussmasse 30 kDa) verwendet.

3.2.4.3 Reinigung des Thioredoxin-SkfA-Fusionsproteins und seiner Mutanten

Das Thioredoxin-SkfA-Fusionsprotein verfügt zwischen der Thioredoxin- und der SkfA-Domäne über einen His(6)-Tag. Daher wurde es mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Dafür wurde zunächst eine Ni-NTA-Affinitätssäule mit Puffer TrisA [25 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; pH = 8.0] mit einer Flussrate von 1 mL/min aquilibriert. Der Überstand des Zelllysats (Kapitel 3.2.3) wurde mit einer Flussrate von 0.7 mL/min auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde solange mit TrisA gespült, bis kein Protein mehr von der Säule eluierte. Danach wurde das in Tabelle 3.3 beschriebene Elutionsprogramm durchgeführt. Die Flussrate betrug weiterhin 0.7 mL/min, die Fraktionsgröße 1.4 mL.

Tabelle 3.3: Elutionsprogramm der Ni-NTA-Affinitätschromatographie des Thioredoxin-SkfA Fusionsproteins.

Zeit	Konzentration TrisB
0 min	0%
45 min	50%
65 min	100%

Die Zusammensetzung der gesammelten Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE untersucht. Fraktionen, in denen das Fusionsprotein enthalten war, wurden vereinigt und mit Hilfe eines Amicon-Ultra-15-Konzentrators (Ausschlussmasse 3 kDa) konzentriert. Zur weiteren Verwendung wurde die erhaltene Lösung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Reinigung der Thioredoxin-SkfA Fusionsproteinvarianten erfolgte nach dem gleichen Protokoll.

3.2.4.4 Reinigung der TEV-Protease

Die TEV-Protease wurde mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt, da das rekombinant hergestellte Enzym einen N-terminalen His(6)-Tag besitzt. Dafür wurde eine Ni-NTA-Affinitätssäule zunächst mit Puffer TevA [20 mM Hepes/HCl; 150 mM NaCl; 5% Glycerol; 2 mM Mercaptoethanol; pH = 7.5] mit einer Flussrate von 1 mL/min äquilibriert. Anschließend wurde der Überstand des Zelllysats mit einer Flussrate von 0.7 mL/min auf die Säule aufgetragen. Es wurde solange mit TevA gespült, bis kein Protein mehr von der Säule eluierte. Im Anschluss wurde das in Tabelle 3.4 zusammengefasste Elutionsprogramm durchgeführt. Die Flussrate betrug 0.7 mL/min und die Fraktionsgröße 1.4 mL.

Tabelle 3.4: Elutionsprogramm der Ni-NTA-Affinitätschromatographie der TEV-Protease. TevB: 20 mM Hepes/HCl; 150 mM NaCl; 5% Glycerol; 2 mM Mercaptoethanol; 400 mM Imidazol; pH = 7.5.

Zeit	Konzentration TevB
0 min	0%
45 min	50%
65 min	100%

Die Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE bestimmt. Fraktionen, die die TEV-Protease in hoher Reinheit enthielten, wurden vereinigt und mittels eines Amicon-Ultra-15-Konzentrators (Ausschlussmasse 10 kDa) konzentriert. Anschließend wurde die Proteinlösung gegen Puffer TevD [20 mM Hepes/HCl; 150 mM NaCl; 5% Glycerol; 5 mM DTT; 0.5 mM EDTA; pH = 7.5] dialysiert. Das erhaltene Dialysat wurde erneut konzentriert (Endkonzentration 3 mg/mL), in Aliquote à 50 µL aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für die weiter Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.2.5 Chemische Rekonstitution von Eisen-Schwefel-Cluster-haltigen Proteinen

Die Radical SAM Enzyme AlbA und SkfB mussten während der Reinigung durch Zugabe von Eisen(III)- und Sulfid-Ionen rekonstituiert werden, da das in *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen vorkommende Eisen-Schwefel-Cluster-Assemblierungssystem nicht ausreichte, um AlbA und SkfB vollständig mit Eisen-Schwefel-Clustern zu beladen. Die Rekonstitution wurde unter streng anaeroben Bedingungen in einem Stickstoffzelt durchgeführt. Sie wurde nach der Ni-NTA-Affinitätschromatographie durchgeführt. Die Proteinkonzentration betrug zwischen 100 μ M und 200 μ M. Zunächst wurden 100 eq DTT [Stammlösung: 25 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 1 M DTT; pH = 8.0] zur Proteinlösung gegeben und die Lösung wurde 1 h bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 eq Ammoniumeisen(III)-citrat [Stammlösung: 25 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 10 mM DTT; 100 mM Ammoniumeisen(III)-citrat pH = 8.0] und es wurde weitere 5 min bei RT inkubiert. Die Lösung färbte sich dabei leicht rötlich. Abschließend erfolgte die Zugabe von 10 eq Lithiumsulfid [Stammlösung: 25 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 10 mM DTT; 100 mM Li₂S pH = 8.0]. Die folgende Inkubation wurde über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Dabei färbte sich die Lösung dunkelbraun, was eine erfolgreiche Rekonstitution anzeigte.

3.2.6 Reinigung von Subtilisin A durch präparative HPLC

Die finale Reinigung von Subtilisin A wurde mittels präparativer *reverse phase* HPLC mit einem präparativen Series 1100/1200 HPLC-System (Agilent) durchgeführt. Zur Stofftrennung wurde eine 250/12 Nucleodur C18ec-Säule (Macherey Nagel), als Laufmittel wurden ddH₂O (LaufA) und Acetonitril (LaufB) mit einem TFA-Anteil von jeweils 0.1% verwendet. Der verwendete Gradient für die Reinigung von Subtilisin A ist in Tabelle 3.5 zusammengefasst. Die Flussrate betrug 18 mL/min, die Fraktionsgröße 9 mL.

Tabelle 3.5: Verwendeter Gradient für die Reinigung von Subtilisin A.

Zeit	Konzentration LaufB
0 min	10%
5 min	45%
25 min	55%
30 min	95%
35 min	95%

Im Anschluss an den Gradienten wurde die Säule mit 10% LaufB gespült (5 min; Flussrate 18 mL/min). Ein Chromatogramm der Reinigung wurde durch das Aufzeichnen der Absorption bei 215 nm und 280 nm erstellt. Fraktionen, die voraussichtlich Peptid enthielten, wurden per *Direct-MS* (Kapitel 3.5.5.4) analysiert. Fraktionen, die Subtilosin A in hoher Reinheit enthielten, wurden vereinigt und lyophilisiert. Der erhaltene weiße Feststoff wurde zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.2.7 Reinigung von SerSkfA und von SerSkfA-Varianten durch analytische HPLC

Nach durchgeführter TEV-Spaltung (Kapitel 3.4.1) wurde die finale Reinigung von SerSkfA und seinen Varianten durchgeführt. Dazu wurde ein analytisches Series 1100/1200 HPLC-System (Agilent) verwendet. Zur Stofftrennung wurde entweder eine EC 125/2 Nucleodur 100-3 C18ec-Säule (Macherey Nagel) oder eine EC 250/4.6 Nucleodur C18 HTec 3 μ m-Säule (Macherey Nagel) verwendet. Als Laufmittel kamen *ddH*₂O (LaufA) und Acetonitril (LaufB), die jeweils 0.1% TFA enthielten, zum Einsatz. Das Injektionsvolumen betrug jeweils 40 μ L (125/2 Nucleodur) bzw. 100 μ L (250/4.6 Nucleodur). Die verwendeten Laufmittelgradienten sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst. Für die Reinigung mit der EC 125/2 Nucleodur 100-3 C18ec-Säule wurde eine Flussrate von 0.2 mL/min und eine Fraktionsgröße von 0.2 mL gewählt. Für die Reinigung mittels der EC 250/4.6 Nucleodur C18 HTec 3 μ m-Säule wurde eine Flussrate von 1 mL/min und eine Fraktionsgröße von 0.5 mL gewählt. Die Säulentemperatur betrug jeweils 30 °C.

Tabelle 3.6: Verwendete Gradienten für die Reinigung von SerSkfA und SerSkfA-Varianten.

125/2 Nucleodur 100-3 C18ec		250/4.6 Nucleodur C18 HTec 3 μ m	
Zeit	Konzentration LaufB	Zeit	Konzentration LaufB
0 min	5%	0 min	5%
5 min	35%	25 min	95%
20 min	55%	28 min	95%
25 min	95%		
28 min	95%		

Im Anschluss an den jeweiligen Gradienten wurde die Säule für 5 min mit 5% LaufB gespült. Ein Chromatogramm der Reinigung wurde durch das Aufzeichnen der Absorption bei 215 nm erstellt. Da an das verwendete HPLC-System bei Bedarf ein Massendetektor angeschlossen werden konnte, konnte in einem separaten Lauf, bei dem keine Fraktionen gesammelt wurden, die

Retentionszeit der jeweiligen SerSkfA-Spezies bestimmt werden. Fraktionen die die jeweilige SerSkfA-Variante in guter Reinheit enthielten, wurden vereinigt und lyophilisiert. Der erhaltene weiße Feststoff wurde zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.3 Naturstoffextraktion

3.3.1 Extraktion von *B. subtilis* 168 Zellpellets mittels Methanol

Die Extraktion von Zellpellets wurde durchgeführt, um zu prüfen, ob die in *B. subtilis* 168 homolog expremierten Subtilosin A-Varianten intrazellulär vorlagen. Dazu wurde jeweils ein Zellpellet einer 300 mL Expression (Kapitel 3.2.2.5) in 50 mL Methanol resuspendiert und inkubiert (2 h; 200 rpm; 4°C). Anschließend wurde die Suspension filtriert und der Überstand am Rotationsverdampfer zu einer Trockne eingengt. Die Trockne wurde in 1 mL 50% (v/v) Methanol resuspendiert und zentrifugiert (30 min; 13200 rpm; 4 °C). Jeweils 50 µL des erhaltenen Überstandes wurden per HPLC-HRMS (Kapitel 3.5.5.3) auf Produktion der Subtilosin A-Variante untersucht.

3.3.2 Extraktion von Kulturüberständen mittels Amberlite XAD16

Die Extraktion von Zellüberständen mit Hilfe des hydrophoben Adsorberharzes Amberlite XAD16 (Sigma-Aldrich) wurde zur Gewinnung von Subtilosin A aus *B. subtilis* 168-Zellüberständen (Kapitel 3.2.1) und zur Überprüfung, ob die von *B. subtilis* 168 homolog expremierten Subtilosin A-Varianten extrazellulär vorlagen (Kapitel 3.2.2.5), durchgeführt.

3.3.2.1 Gewinnung von Subtilosin A aus *B. subtilis* 168-Kulturüberstand

Der *B. subtilis* 168-Kulturüberstand (Kapitel 3.2.1) wurde mit einer 25% igen (w/v) Amberlite XAD16-Suspension extrahiert. Dazu wurden 5 mL der Suspension zu je einem Liter Überstand gegeben. Anschließend wurde die Lösung unter rühren für 2 h inkubiert und filtriert. Das erhaltene Amberlite XAD16-Material wurde mit 250 mL *ddH*₂O gewaschen und im Anschluss mit 100 mL Methanol eluiert, um die adsorbierten Verbindungen vom Harz zu trennen. Das Methanolextrakt wurde mittels Rotationsverdampfer zur Trockne reduziert. Die Trockne wurde in 20 mL eines 1:1 (v/v)-Gemisches aus 1-Butanol und *ddH*₂O aufgenommen. Anschließend wurden organische Phase und wässrige Phase separiert. Die organische Phase wurde erneut am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 50% (v/v) Methanol aufgenommen, zentrifugiert (30 min; 13200 rpm; 4 °C) und per präparativer HPLC final gereinigt (Kapitel 3.2.6).

3.3.2.2 Extraktion von Subtilosin A-Varianten aus *B. subtilis* 168-Kulturüberstand

300 mL *B. subtilis* 168-Kulturüberstand (Kapitel 3.2.2.5) wurden mit jeweils 5 mL einer 25%igen (w/v) Amberlite XAD16-Suspension versetzt und 2 h unter Rühren inkubiert. Anschließend wurde filtriert und das erhaltene Amberlite XAD16-Adsorberharz wurde mit 100 mL *ddH*₂O gewaschen. Es folgte die Elution der an das Amberlite XAD16-Material gebundenen hydrophoben Verbindungen mit 50 mL Methanol. Im Anschluss wurde das Methanolextrakt am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Diese wurde in 1 mL 50% (v/v) Methanol gelöst, zentrifugiert (30 min; 13200 rpm; 4 °C) und mittels HPLC-HRMS (Kapitel 3.5.5.3) analysiert.

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Spaltung der Trx-SkfA-Fusionsproteinvarianten mit der TEV-Protease

Jede Trx-SkfA-Fusionsproteinvariante enthielt in dem Linkerbereich zwischen der SkfA- und der Thioredoxindomäne eine für die TEV-Protease spezifische ENLYFQS-Spaltungssequenz. Für die Spaltung wurde die, nach der Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie (Kapitel 3.2.4.3) erhaltene, Trx-SkfA Lösung gegen Puffer TevR [25 mM Tris/HCl; 50 mM NaCl; 1 mM DTT; 0.5 mM EDTA; pH = 7.2] dialysiert. Anschließend wurde die Lösung mit Hilfe eines Amicon-Ultra-15-Konzentrators (Ausschlussmasse 3 kDa) auf eine Konzentration von 8 mg/mL bis 10 mg/mL konzentriert. Die TEV-Spaltung wurde durch Zugabe der gereinigten TEV-Protease (Kapitel 3.2.4.4; 1 Aliquot pro 1 mL Trx-SkfA Konzentrat) und anschließende Inkubation über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Im Anschluss wurde die erhaltene SerSkfA-Variante mittels analytischer HPLC gereinigt (Kapitel 3.2.7).

3.4.2 SAM-Spaltungsaktivitätsassays

SAM-Spaltungsaktivitätsassays werden durchgeführt, um Proteine als Radical SAM Enzyme zu identifizieren. Die Assays wurden unter streng anaeroben Bedingungen durchgeführt. Um Sauerstoff aus den aerob gereinigten Proteinen (Kapitel 3.2.4.1 und 3.2.4.2) zu entfernen, wurde je ein Aliquot Enzymlösung (200 µL) mit 50 µL Recon Puffer [25 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 10 mM DTT; pH = 8.0] versetzt und über Nacht bei 4 °C im Stickstoffzelt inkubiert. In den Assays wurden 20 µM Protein, 300 µM SAM [Stammlösung: 25 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 10 mM DTT; 10 mM SAM; pH = 8.0] und 300 µM Natriumdithionit [Stammlösung: 25 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 10 mM DTT; 10 mM DT; pH = 8.0] eingesetzt. Die Zugabe von DT erfolgte dabei vor der Zugabe von SAM. In Kontrollen wurde entweder auf das Enzym oder auf das Reduktionsmittel verzichtet. Das Gesamtvolumen eines Assays betrug 47.5 µL. Die Reaktionstemperatur lag für AlbA bei 25 °C und für SkfB bei 23 °C. Die Reaktion wurde jeweils durch

die Zugabe von 2.5 μ L Ameisensäure gestoppt. Anschließend wurden die Assays zentrifugiert (30 min; 13200 rpm) und per HPLC-MS (Kapitel 3.5.4) analysiert.

3.4.2.1 SAM-Spaltungsaktivitätsassays mit DMSO

Um die SAM-Spaltungsaktivität von AlbA unter Abhängigkeit des DMSO-Anteils zu untersuchen, wurde den Assays DMSO bis zu einer Konzentration von 44.1% hinzugefügt. Die restliche Zusammensetzung war identisch mit der oben beschriebenen Assays. Die Aufarbeitung wurde ebenfalls wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben durchgeführt.

3.4.3 Vorläuferpeptidmodifikationsassays

Die Vorläuferpeptidmodifikationsassays wurden durchgeführt, um die von den untersuchten Radical SAM Enzymen katalysierten Reaktionen zu charakterisieren.

3.4.3.1 Modifikationsassays mit dem Subtilisin A Vorläuferpeptid SboA

Die Modifikationsassays mit dem Subtilisin A Vorläuferpeptid SboA (und Varianten) wurden unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Zur Entfernung des Sauerstoffs aus den aerob gereinigten AlbA und AlbA-Varianten (Kapitel 3.2.4.1) wurde je ein Aliquot Enzymlösung (200 μ L) mit 50 μ L Recon Puffer [25 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 10 mM DTT; pH = 8.0] versetzt und über Nacht bei 4 °C im Stickstoffzelt inkubiert. Ein Assay hatte die folgende Zusammensetzung: 20 μ M Protein, 200 μ M Vorläuferpeptid [Stammlösung: 5 mM Vorläuferpeptid in DMSO], 1 mM SAM [Stammlösung: 25 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 10 mM DTT; 10 mM SAM; pH = 8.0], 1 mM Natriumdithionit [Stammlösung: 25 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 10 mM DTT; 10 mM DT; pH = 8.0] und 16% (v/v) DMSO mit einem Gesamtvolumen von 50 μ L. In die Enzymlösung wurde zunächst das Natriumdithionit gegeben. Danach erfolgte die Zugabe von DMSO und des Vorläuferpeptids. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von SAM gestartet. Der Assay wurde bei einer Temperatur von 25 °C durchgeführt. Nach 5 h wurde die Reaktion durch die Zugabe von 1 mL Methanol abgebrochen und der Assay wurde aufgearbeitet. In Kontrollen wurde auf die Zugabe von SAM und von Enzym verzichtet.

Modifikationsassays mit Iodacetamidzugabe

Um während der Assays nicht modifizierte Cysteinreste am Vorläuferpeptid zu markieren, wurde die Reaktionslösung vor der Zugabe von Methanol mit 10 μ L einer 100 mM Iodacetamidlösung [Lösungsmittel: Recon Puffer] versetzt und 1 h bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde 1 mL Methanol hinzugefügt und der Assay wurde aufgearbeitet.

Zeitabhängige Vorläuferpeptidmodifikationsassays

Um die Zeitabhängigkeit der Thioetherbrückenbildung zu untersuchen wurden Assays nach verschiedenen Zeiten mit 10 μ L einer 100 mM Iodacetamidlösung [Lösungsmittel: Recon Puffer] versetzt und 1 h bei 25 °C inkubiert. Dadurch stoppte die Reaktion, da noch nicht reagierte Cysteinreste irreversibel alkyliert wurden. Die Massendifferenz der unterschiedlich oft verbrückten SboA-Derivate wurde dadurch ebenfalls erhöht, was eine Differenzierung der verschiedenen Spezies über HPLC-HRMS-Analytik ermöglichte. Anschließend erfolgte die Zugabe von jeweils 1 mL Methanol und die Assays wurden aufgearbeitet.

Aufarbeitung der Vorläuferpeptidmodifikationsassays

Nach Zugabe von Methanol wurde die erhaltene Lösung kurz vortexiert, über Nacht bei 4 °C inkubiert und das präzipitierte Protein zentrifugiert (30 min; 13200 rpm; 4 °C). Der Überstand wurde in ein neues 1.5 mL-Reaktionsgefäß überführt und mit Hilfe einer Concentrator 5301 Vakuumzentrifuge (Eppendorf) bei 25 °C bis 37 °C zur Trockne eingengt. Der erhaltene Feststoff wurde in 110 μ L 1 mM TCEP-Lösung [Lösungsmittel: Methanol] gelöst und per HPLC-HRMS (Kapitel 3.5.5.1) analysiert.

Vorläuferpeptidmodifikationsassays für Thermolysinverdau

Für den Thermolysinverdau wurden Assays mit einer SboA-Konzentration von 2 mM [Stammlösung: 20 mM Vorläuferpeptid in DMSO] durchgeführt. Die Extraktion des modifizierten Vorläuferpeptids wurde ebenfalls mit 1 mL Methanol durchgeführt. Am Ende der Aufarbeitung wurden drei Methanolextrakte zu einer Trockne, mit der ein Thermolysinverdau durchgeführt wurde (Kapitel 3.4.4), kombiniert.

Carboxypeptidaseverdau von modifizierten SboA

Für den Carboxypeptidaseverdau wurde zunächst ein Modifikationsassay mit SboA angesetzt. Nach fünfstündiger Inkubation bei 25 °C wurde die Reaktionslösung mit jeweils 10 μ L einer Carboxypeptidase A-haltigen [Stammlösung: 25 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 10 mM DTT; Carboxypeptidase A 100 U/mL; pH = 8.0] und einer Carboxypeptidase B-haltigen [Stammlösung: 25 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 10 mM DTT; Carboxypeptidase B 100 U/mL; pH = 8.0] Lösung versetzt. Es wurde weitere 4 h bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde der Assay mittels HPLC-HRMS analysiert (Kapitel 3.5.5.1).

3.4.3.2 Modifikationsassays mit dem Sporulation Killing Factor Vorläuferpeptid SerSkfA

Die Modifikationsassays mit dem Sporulation Killing Factor Vorläuferpeptid SerSkfA (und Varianten) wurden unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Zur Entfernung des Sauerstoffs aus den aerob gereinigten SkfB und SkfB-Varianten (Kapitel 3.2.4.2) wurde je ein Aliquot Enzymlö-

sung (200 μL) mit 50 μL Recon Puffer [25 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 10 mM DTT; pH = 8.0] versetzt und über Nacht bei 4 °C im Stickstoffzelt inkubiert. Ein Assay hatte die folgende Zusammensetzung: 20 μM Protein, 200 μM Vorläuferpeptid [Stammlösung: 5 mM Vorläuferpeptid in DMSO], 1 mM SAM [Stammlösung: 25 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 10 mM DTT; 10 mM SAM; pH = 8.0] und 1 mM Natriumdithionit [Stammlösung: 25 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 10 mM DTT; 10 mM DT; pH = 8.0] mit einem Gesamtvolumen von 50 μL . In die Enzymlösung wurde zunächst das Natriumdithionit gegeben. Danach erfolgte die Zugabe des Vorläuferpeptids. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von SAM gestartet. Der Assay wurde bei einer Temperatur von 23 °C durchgeführt. Nach 4 h wurde die Reaktion durch Luftzugabe gestoppt. Vor der Analyse mittels HPLC-HRMS (Kapitel 3.5.5.1) wurde jeder Assay nochmals mit Luft geflutet, damit sich Disulfidbrücken ausbilden konnten. In der Kontrolle wurde auf die Zugabe von SkfB verzichtet.

Modifikationsassays mit Iodacetamidzugabe

Um während der Assays nicht modifizierte Cysteinreste am Vorläuferpeptid zu markieren, wurde die Reaktionslösung nach 4 h mit 5 μL einer 100 mM Iodacetamidlösung [Lösungsmittel: Recon Puffer] versetzt und 1 h bei 23 °C inkubiert. Anschließend wurde der Assay mittels HPLC-HRMS (Kapitel 3.5.5.1) analysiert.

3.4.4 Thermolysinverdau

Der Thermolysinverdau von Subtilisin A und dem dreifach verbrückten SboA-Derivat wurde nach einem leicht abgewandelten Protokoll von *Babasaki et al.* (Babasaki et al., 1985) durchgeführt. Der Verdauassay besaß jeweils eine Thermolysinkonzentration von 1 mg/mL [Stammlösung: 100 mM MES; 10 mM CaCl_2 ; 10 mg/mL Thermolysin; pH = 6.5]. Als Puffer wurde MesA [100 mM MES; 10 mM CaCl_2 ; pH = 6.5] verwendet. Das Assayvolumen betrug jeweils 100 μL . Es wurden 0,1 mg Subtilisin A (Kapitel 3.2.6) oder die Trockne von drei SboA-Modifikationsassays mit erhöhter SboA-Menge (Kapitel 3.4.3.1) verdaut. Jeder Verdauassay wurde 75 h bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Assay zentrifugiert (30 min; 13200 rpm) und mit Hilfe von HPLC-HRMS (Kapitel 3.5.5.2) untersucht.

3.5 Analytische Methoden

3.5.1 Bestimmung des Eisengehalts von Proteinen

Die Bestimmung des Eisengehalts wurde nach einem Protokoll von *Fish et al.* (Fish, 1988) durchgeführt. Vorhandenes Eisen(II) wird dabei mit Ferene (Dinatrium-3-(2-Pyridyl)-5,6-bis(5-sulpho-2-furyl)-1,2,4-Triazin; Abbildung 3.1) komplexiert. Der Eisen(II)-Ferene Komplex besitzt

einen hohen Extinktionskoeffizienten von ca. $35000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei einer Wellenlänge von 593 nm, über den die Eisenkonzentration bestimmt werden kann.

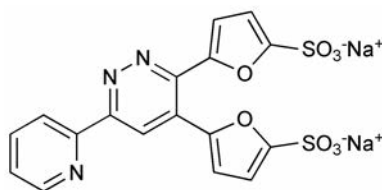


Abbildung 3.2: Struktur von Ferene.

Zur Eisenbestimmung wurden zunächst die zu untersuchenden Proteinlösungen [$20 \mu\text{L} - 50 \mu\text{L}$; Konzentration Stammlösung: $50 \mu\text{M} - 70 \mu\text{M}$] mit $dd\text{H}_2\text{O}$ auf ein Volumen von $100 \mu\text{L}$ aufgefüllt. Anschließend wurden je $100 \mu\text{L}$ 1%ige (v/v) Salzsäure hinzugegeben und 10 min bei 80°C und 300 rpm im Heizschüttler inkubiert, um in Proteinen gebundenes Eisen zu lösen. Nachdem die Proben abgekühlt waren, wurden sie jeweils mit $500 \mu\text{L}$ 7.5%iger (w/v) Ammoniumacetatlösung, $100 \mu\text{L}$ 4%iger (w/v) Ascorbinsäurelösung, $100 \mu\text{L}$ 2.5%iger (w/v) SDS-Lösung und $100 \mu\text{L}$ 1.5%iger (w/v) Ferene-Lösung versetzt. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Proben kurz vortexiert. Abschließend wurden die Proben 5 min bei 9000 rpm zentrifugiert. Die Bestimmung der Absorption bei einer Wellenlänge von 593 nm wurde mit einem Ultaspec 3000 Photometer (Pharmacia Biotech) durchgeführt. Als Kontrolle wurde $dd\text{H}_2\text{O}$ verwendet. Eine Eichgerade wurde mit Eisenstandards [Eisengehalt: 2 nmol – 40 nmol] erstellt.

3.5.2 Bestimmung des Sulfidgehalts von Proteinen

Die Bestimmung des Sulfidgehalts wurde nach einem Protokoll von *Siegel et al.* (Siegel, 1965) durchgeführt. Dazu werden aus der Probe gefällte Sulfid-Ionen durch Zugabe von Säure und DMPD für die Bildung von Metylenblau genutzt (Abbildung 3.3). Durch Bestimmung der Absorption bei einer Wellenlänge von 670 nm - dem Absorptionsmaximum von Metylenblau - kann der Sulfidgehalt berechnet werden werden.

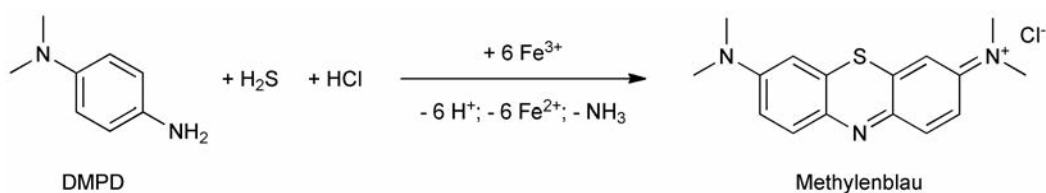


Abbildung 3.3: Bildungsreaktion von Metylenblau aus DMPD und Schwefelwasserstoff.

Zur Bestimmung des Sulfidgehaltes wurden zunächst die zu untersuchenden Proteinlösungen [20 μ L – 50 μ L; Konzentration Stammlösung: 50 μ M – 70 μ M] mit *ddH*₂O auf ein Volumen von 200 μ L aufgefüllt. Danach wurden die Proben mit 600 μ L einer 1%igen (w/v) Zinkacetatlösung und 50 μ L 7%iger (w/v) Natronlauge versetzt. Es wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei denaturierten die Proteine und freigesetzte Sulfid-Ionen wurden in Form von schwerlöslichem Zinksulfid gebunden. Im Anschluss wurden die Proben für 10 s bei 9000 rpm zentrifugiert. Die weiteren Schritte wurden für jede Probe separat durchgeführt, um den Verlust an Schwefelwasserstoff zu minimieren. Das bei der Zentrifugation entstandene Pellet wurde durch Zugabe von 150 μ L 0.1%iger (w/v) DMPD-Lösung [in 5 M Salzsäure] gelöst. Umgehend wurden 150 μ L einer 10 mM Eisen(III)chloridlösung [in 1 M Salzsäure] hinzugegeben. Anschließend wurde die Probe für 30 s vortexiert und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bestimmung der Absorption bei einer Wellenlänge von 670 nm erfolgte mit einem Ultraspec 3000 Photometer (Pharmacia Biotech). Als Kontrolle wurde *ddH*₂O verwendet. Eine Eichgerade wurde mit Sulfidstandards [Sulfidgehalt: 2 nmol – 50 nmol; Stammlösung enthielt 10 mM Natronlauge] erstellt.

3.5.3 Peptidmassenfingerabdruck

Der Peptidmassenfingerabdruck (engl. *peptide mass fingerprinting*) wurde durchgeführt, um die Richtigkeit der heterolog expremierten Proteine zu bestätigen. Dazu wurde zunächst eine SDS-PAGE des zu untersuchenden Proteins durchgeführt. Die Bande, die dem berechneten Molekulargewicht des Proteins entsprach, wurde ausgeschnitten und in ein 1.5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Die Gelbande wurde mit 200 μ L Waschlösung [200 mM NH_4HCO_3 ; 50% (v/v) CH_3CN] versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel mit Hilfe einer Concentrator 5301 Vakuumzentrifuge (Eppendorf) bei 37 °C wieder entfernt. Durch Zugabe von 20 μ L einer Trypsin-haltigen Lösung [0.02 μ g/ μ L Trypsin; 10% (w/v) NH_4HCO_3 ; 10% (v/v) CH_3CN ; pH = 8.1] wurde der Verdau des denaturierten Proteins innerhalb der Gelbande initiiert. Nach 45 minütiger Inkubation bei 37 °C wurde überschüssige Trypsin-haltige Lösung entfernt und es wurde für weitere 16 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Gelbande mit 25 μ L Diffusionslösung [1% (v/v) TFA; 10 % (v/v) CH_3CN ; pH = 8.1] versetzt und 45 min im Ultraschallbad bei Raumtemperatur behandelt, um Peptidfragmente aus dem Gel zu eluieren. Die erhaltene Lösung wurde mittels eines Nano RSLC Orbitrap Velos Pro Systems (Thermo Fischer Scientific) analysiert. Die Identifikation der Proteine gelang durch Vergleich des Peptidmassenfingerabdrucks mit der MASCOT-Datenbank.

3.5.4 HPLC-MS

Die HPLC-MS-Analysen (engl. *high performance liquid chromatography mass spectrometry*) wurden mit einem Series 1100/1200 HPLC-System (Agilent) mit angeschlossenen Agilent Se-

ries 1100 MSD Massendetektor (HP) durchgeführt, um die SAM-Spaltungsaktivität der untersuchten Radical SAM Enzyme zu überprüfen (Kapitel 3.4.2). Zur Stofftrennung wurde eine Hypercarb 100/2.1 5 μ m-Säule (Thermo Scientific) verwendet. Als Laufmittel wurden ddH₂O (LaufC), das 20 mM NFPA enthielt, und Acetonitril (LaufD) verwendet. Das Injektionsvolumen betrug 12 μ L und die Flussrate 0.2 mL/min. Der verwendete Gradient ist in Tabelle 3.7 zusammengefasst. Die Säulentemperatur wurde auf 20 °C reguliert.

Tabelle 3.7: Verwendeter Gradient für die Trennung der SAM-Spaltungsprodukte.

Zeit	Konzentration LaufD
0 min	0%
25 min	100%
27 min	100%

Im Anschluss an den Gradienten wurde die Säule 7 min mit LaufC gespült. Das Chromatogramm der Trennung wurde durch eine UV-Detektoreinheit, deren Wellenlänge auf 260 nm eingestellt war, ermittelt. Der angeschlossene Massendetektor wurde im *Single-Ion Mode* (m/z: 151.2; m/z: 253.1; m/z: 400.1; m/z: 299.1) betrieben. Eine Eichgerade, die die 5'-Deoxyadenosinkonzentration mit dem Integral der UV-Absorption bei 260 nm korreliert, wurde ebenfalls erstellt (Anhang).

3.5.5 HPLC-HRMS

Für die HPLC-HRMS-Analysen (engl. *high performance liquid chromatography high resolution mass spectrometry*) wurde ein Series 1100/1200 HPLC-System (Agilent), das mit einem LTQ-FT-ICR-Massenspektrometer (Thermo Fischer Scientific) verbunden war, verwendet. Durch die Verwendung eines LTQ-FT-ICR-Massenspektrometers ist eine exakte Massenbestimmung möglich, da dessen Messgenauigkeit im Idealfall bei einer maximalen Abweichung von 2 ppm liegt. Die HPLC-HRMS wurde für die Analyse der Vorläuferpeptidmodifikationsassays, der Thermolysinverdaue, der Carboxypeptidaseverdaue und der produzierten Subtilisin A-Varianten verwendet.

3.5.5.1 Analyse der Vorläuferpeptidassays und der Carboxypeptidaseverdaue

Für die Analyse der Vorläuferpeptidassays und der Carboxypeptidaseverdaue (Kapitel 3.4.3) kam eine Jupiter 5u C4 300A 150/2 5 μ m-Säule (Phenomenex) zum Einsatz. Als Laufmittel wurden ddH₂O (LaufA) und Acetonitril (LaufB), die einen TFA-Anteil von jeweils 0.1% (v/v) besa-

ßen, verwendet. Die Flussrate lag bei 0.5 mL/min. Das Injektionsvolumen betrug, wie in Kapitel 3.4.3 beschrieben, zwischen 45 µL und 100 µL. Der verwendete Laufmittelgradient ist in Tabelle 3.8 gezeigt. Die Säulentemperatur betrug 30 °C.

Tabelle 3.8: Verwendeter Gradient für die Trennung der Vorläuferpeptidassays, der Carboxypeptidaseverdaue und der Thermolysinverdaue.

Zeit	Konzentration LaufB
0 min	10%
20 min	40%
35 min	95%
37 min	95%

Im Anschluss an den Gradienten wurde die Säule für 6 min mit 10% LaufB gespült. Während des Laufes wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 215 nm aufgenommen, um ein Chromatogramm der Trennung zu erhalten. Das angeschlossene LTQ-FT-ICR-Massenspektrometer detektierte Ionen mit einem Masse zu Ladungsverhältnis von 200 bis 2000 Einheiten. Für die Analyse der SerSkfA-Modifikationsassays wurde zusätzlich eine *in-source fragmentation* mit einer Spannung von 30 V durchgeführt, um die Bildung von SerSkfA-TFA-Addukten zu verhindern.

3.5.5.2 Analyse der Thermolysinverdaue

Für die Trennung der Thermolysinverdaue (Kapitel 3.4.4) wurde eine Jupiter 5u C4 300A 150/2 5µm-Säule (Phenomenex) verwendet. Als Laufmittel kamen ddH₂O (LaufE) und Acetonitril (LaufF), die jeweils einen Ameisensäure-Anteil von 0.1% (v/v) besaßen, zum Einsatz. Die Flussrate lag bei 0.2 mL/min und das Injektionsvolumen bei 90 µL. Die Temperatur der Säule wurde auf 30 °C reguliert. Der Gradient der Trennung ist in Tabelle 3.9 zusammengefasst.

Im Anschluss an den Gradienten wurde die Säule jeweils 8 min mit 2% LaufF gespült. Zur Aufnahme eines Chromatogramms der Trennung wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 215 nm detektiert. Das mit dem HPLC-System verknüpfte LTQ-FT-ICR-Massenspektrometer detektierte Ionen mit einem Masse zu Ladungsverhältnis von 200 bis 2000 Einheiten. Falls benötigt, wurden MSMS-Spektren von spezifischen Peptidfragmenten gemessen.

Tabelle 3.9: Verwendeter Gradient für die Trennung der Thermolysinverdaue.

Zeit	Konzentration LaufF
0 min	2%
3 min	2%
5 min	10%
35 min	55%
38 min	100%
40 min	100%

3.5.5.3 Analyse der Produktion der generierten Subtilosin A-Varianten

Für die Analyse der Produktion der Subtilosin A-Varianten (Kapitel 3.3.1 und 3.3.2.2) wurde eine EC 125/2 Nucleodur 100-3 C18ec-Säule (Macherey Nagel) verwendet. Als Laufmittel kamen ddH_2O (LaufG) und Acetonitril (LaufH), denen jeweils 0.05% (v/v) Ameisensäure zugesetzt war, zum Einsatz. Die Flussrate lag bei 0.2 mL/min, die Säulentemperatur bei 30 °C und das Injektionsvolumen betrug jeweils 50 μ L. Der verwendete Gradient ist in Tabelle 3.10 zusammengefasst.

Tabelle 3.10: Verwendeter Gradient für die HPLC-HRMS-Analyse der produzierten Subtilosin A-Spezies.

Zeit	Konzentration LaufH
0 min	2%
5 min	2%
7 min	10%
37 min	40%
42 min	95%
45 min	95%

Nach dem Gradienten wurde die Säule 5 min mit 95% Laufmittel LaufF gespült. Das Chromatogramm der Trennung wurde durch Aufzeichnung der Absorption bei einer Wellenlänge von 215 nm erstellt. Durch das angeschlossene LTQ-FT-ICR-Massenspektrometer wurden Ionen mit einem Masse zu Ladungsverhältnis von 200 bis 2000 Einheiten detektiert.

3.5.5.4 Direkte Massenbestimmung (Direct-MS)

Für die direkte Massenbestimmung (Direct-MS) wurde keine Trennsäule verwendet. Die Probe wurde direkt in den Massendetektor injiziert. Als Laufmittel wurde Acetonitril mit einem TFA-Anteil von 0.1% eingesetzt. Die Flussrate betrug 0.5 mL/min. Es wurde ein Bereich mit einem Masse zu Ladungsverhältnis von 200 bis 2000 Einheiten detektiert.

3.6 Spektroskopische Methoden

3.6.1 UV-Vis-Spektroskopie

3.6.1.1 UV-Vis-Spektroskopie von Eisen- und Schwefel-haltigen Proteinen

Für die UV-Vis-Spektroskopie von Eisen- und Schwefel-haltigen Proteinen wurde ein Ultraspec 3000 Spektrometer (Amersham Biosciences) verwendet. Die Messungen wurden unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Das Datenintervall betrug, bei einer Messgeschwindigkeit von 900 nm/min 0.5 nm. Die Konzentration der zu analysierenden Proteinlösung betrug 15 μ M bis 20 μ M. Das Messvolumen lag bei 800 μ L. Zur Analyse reduzierter Proben wurde die Lösung mit 100 eq Natriumdithionit versetzt. Als Referenz wurde der Puffer TrisA [25 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; pH = 8.0] verwendet.

3.6.1.2 AlbA-SboA-Interaktionsspektroskopie

Die AlbA-SboA-Interaktionsspektroskopie wurde ebenfalls unter aeroben Bedingungen mit einem Ultraspec 3000 Spektrometer (Amersham Biosciences) durchgeführt. Die Messgeschwindigkeit lag ebenfalls bei 900 nm/min und das Datenintervall bei 0.5 nm. Die Proteinkonzentration an Radical SAM Enzym betrug jeweils 15 μ M. Jeder Probe wurde DMSO zu einem Anteil von 16% (v/v) zugesetzt. Für die Messung von AlbA-SboA bzw. AlbA-II-SboA-Interaktionsspektrum wurde die Probe mit dem jeweiligen Vorläuferpeptid zu einer Konzentration von 60 μ M versetzt. Das Probenvolumen betrug jeweils 800 μ L. Als Referenz diente Puffer TrisA [25 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; pH = 8.0] mit einem DMSO-Anteil von 16% (v/v).

3.6.2 EPR-Spektroskopie

Zur Aufnahme der Tieftemperatur EPR-Spektren von AlbA und SkfB wurde ein Bruker ESP 300E EPR Spektrometer verwendet. Es wurden jeweils AlbA und SkfB verwendet, die unter streng anaeroben Bedingungen entsalzt wurden (Kapitel 3.2.4.1 und 3.2.4.2). Das Probenvolumen betrug jeweils 400 μ L. Die Proben wurden unter streng anaeroben Bedingungen in die EPR-Röhrchen gefüllt und umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Falls reduziertes Protein untersucht werden sollte, wurden jeweils 500 μ L Proteinlösung mit 50 μ L einer Natrium-

dithionitlösung [25 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 100 mM DT; pH = 8.0] versetzt. Die gezeigten EPR-Spektren entsprechen einer Akkumulation von 16 Messungen. Die Bedingungen für alle gemessenen EPR-Spektren sind in Tabelle 3.11 zusammengefasst.

Tabelle 3.11: Messbedingungen der EPR-Spektren. Es wurde jeweils rekonstituiertes Protein eingesetzt.

Protein	Konzentration	Temperatur	Frequenz	Mikrowellenleistung
AlbA	95 μ M	2.7 K	9.23924 GHz	34 dB
red. AlbA	86 μ M	2.7 K	9.24024 GHz	34 dB
AlbA ^{C129A,C133A,C136A}	205 μ M	2.6 K	9.24137 GHz	46 dB
red. AlbA ^{C129A,C133A,C136A}	186 μ M	2.4 K	9.24052 GHz	46 dB
AlbA ^{C408A,C414A,C417A}	80 μ M	2.7 K	9.23840 GHz	46 dB
red. AlbA ^{C408A,C414A,C417A}	73 μ M	2.7 K	9.23736 GHz	46 dB
SkfB	93 μ M	14 K	9.24096 GHz	48 dB
red. SkfB	85 μ M	7 K	9.24226 GHz	48 dB
red. SkfB ^{C117A,C121A,C124A}	191 μ M	20 K	9.24463 GHz	28 dB
SkfB ^{C380A,C385A,C387A}	174 μ M	20 K	9.24399 GHz	20 dB
red. SkfB ^{C380A,C385A,C387A}	158 μ M	10 K	9.24514 GHz	28 dB

Zur Messung der temperaturabhängigen EPR-Spektren wurde die Mikrowellenleistung auf 10 dB eingestellt.

3.7 Kristallisation

Zur Strukturbestimmung sollte anaerob gereinigtes SkfB kristallisiert werden. Für die Kristallisation wurde auf das Verfahren der Dampfphasendifusion (*sitting drop*) zurückgegriffen. Alle Arbeiten wurden in Kooperation mit Dr. Gunhild Layer an der TU-Braunschweig durchgeführt.

Für die Kristallisation wurde frisch anaerob gereinigtes SkfB auf eine Konzentration von ca. 10 mg/mL unter anaeroben Bedingungen konzentriert. Die Lösung wurde mit 2 mM SAM [Stammlösung: 200 mM SAM; 25 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; pH = 8.0] versetzt und umgehend für die Kristallisation unter streng anaeroben Bedingungen verwendet. Dafür wurden Kristallisationsplatten mit jeweils 96 Reservoirs genutzt. In einer Kristallisationsbedingung wurden jeweils 1.5 μ L Proteinlösung mit 1.5 μ L Reservoirlösung [Reservoirvolumen: 100 μ L] gemischt. Es wur-

den Kristallisationsscreens von Qiagen verwendet. Nach erfolgreichem Ansetzen aller Bedingungen wurden die Kristallisationsplatten unter anaeroben Bedingungen bei 17 °C gelagert.

4. Ergebnisse

4.1 Studien zur Subtilosin A Biosynthese

4.1.1 Klonierung, Expression und Reinigung von AlbA

Das Gen des Radical SAM Enzyms AlbA aus *B. subtilis* 168 wurde von Antje Schäfer (AG Marahiel) im Rahmen der Diplomarbeit von Michael Gattner (Gattner, 2010) in den Expressionsvektor pETM-10 kloniert (Abbildung 4.1a). Die Expression wurde in *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen durchgeführt. Das Reinigungsprotokoll wurde für die hier beschriebenen und durchgeführten Arbeiten, überarbeitet. Im Vergleich zu den Diplomarbeiten von Michael Gattner (Gattner, 2010) und Leif Flühe (Flühe, 2010) wurde AlbA hier mittels Ni^{2+} -NTA Affinitätschromatographie mit einem flachen Imidazolgradienten von den restlichen Proteinkomponenten getrennt. Dadurch ließ sich die Ausbeute an Radical SAM Enzym auf ca. 11 mg pro Liter Bakterienkultur erhöhen. Die Reinheit des erhaltenen Proteins ist in Abbildung 4.1b gezeigt.

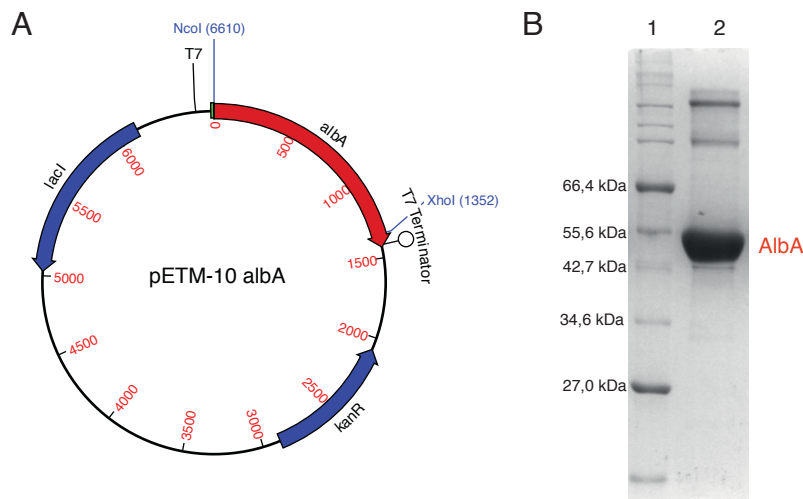


Abbildung 4.1: Klonierung, Expression und Reinigung von AlbA. **(A)** Der von Antje Schäfer hergestellte pETM-10 *albA*-Expressionsvektor. **(B)** SDS-PAGE nach der Reinigung per Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie 1: Marker; 2: vereinigte AlbA enthaltende Fraktionen

4.1.2 Reinigung der AlbA-Mutanten innerhalb des CXXXCXXC-Motivs

Die vier AlbA-Mutanten AlbA^{C129A}, AlbA^{C133A}, AlbA^{C136A} und AlbA^{C129A C133A C136A}, die Mutationen innerhalb des für Radical SAM Enzyme charakteristischen CXXXCXXC-Motivs enthalten, wurden über die SLIM-Methode generiert. Ihre Reinigung erfolgte analog der von AlbA (Abbildung 4.2). Die Ausbeute der AlbA-Varianten lag zwischen 10 mg bis 12 mg pro Liter Bakterienkultur.

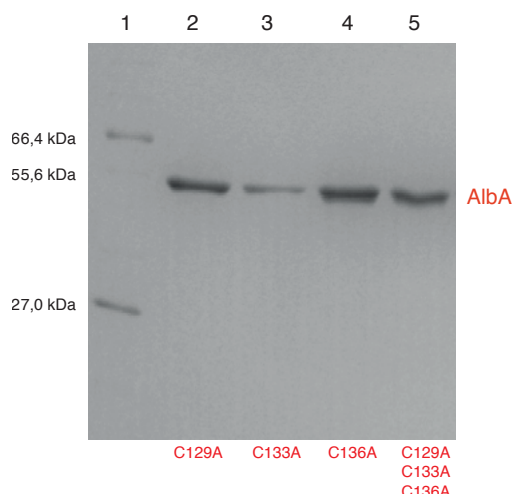


Abbildung 4.2: SDS-PAGE der per Ni^{2+} -Affinitätschromatographie gereinigten AlbA-Mutanten. 1: Marker; 2: $\text{AlbA}^{\text{C129A}}$, 3: $\text{AlbA}^{\text{C133A}}$; 4: $\text{AlbA}^{\text{C136A}}$; 5: $\text{AlbA}^{\text{C129A C133A C136A}}$

4.1.3 Bestimmung des Eisen- und Schwefelgehalts von AlbA und AlbA-Varianten

Der Eisen- bzw. Schwefelgehalt von AlbA wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht erneut bestimmt. Daher ist auf vorherige Ergebnisse, die in den Diplomarbeiten von Michael Gattner und Leif Flühe erzielt wurden, verwiesen. Nach der Reinigung konnten in AlbA 0.6 Äquivalente Eisen in Form von Fe(III) und 0.5 Äquivalente Schwefel in Form von Sulfid nachgewiesen werden (Gattner, 2010). Da diese Mengen für ein Fe/S-Cluster-enthaltendes Protein sehr gering sind, wurde es chemisch rekonstituiert. Dabei färbte sich die Proteinlösung von Hellbraun zu einem dunklen Kastanienbraun. Der Eisen- und Schwefelgehalt von AlbA erhöhte sich durch die Rekonstitution drastisch auf 7.2 ± 0.3 Äquivalente Eisen bzw. 7.7 ± 0.4 Äquivalente Schwefel (Flühe, 2010).

Der Eisengehalt der rekonstituierten AlbA-Varianten $\text{AlbA}^{\text{C129A}}$ und $\text{AlbA}^{\text{C129A C133A C136A}}$ wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit bestimmt. Die Eisenmenge wurde mit folgender Eichgerade (Bestimmung siehe Tabelle A.1 und Abbildung A.1) aus der jeweiligen optischen Dichte bei 593 nm (OD_{593}) berechnet:

$$n(\text{Fe}) = 29.9 \text{ nmol} \cdot \text{OD}_{593}$$

Die Ergebnisse der $\text{AlbA}^{\text{C129A}}$ und $\text{AlbA}^{\text{C129A C133A C136A}}$ -Mutanten sind in Tabelle 4.1 bzw. Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Tabelle 4.1: Bestimmung des Eisengehaltes der rekonstituierten AlbA^{C129A}-Variante.

n (AlbA ^{C129A})	OD ₅₉₃	n (Fe ³⁺)	Verhältnis AlbA ^{C129A} :Fe ³⁺
1.34 nmol	0.259	7.74 nmol	1 : 5.78
1.68 nmol	0.329	9.84 nmol	1 : 5.86
1.68 nmol	0.322	9.63 nmol	1 : 5.73
2.01 nmol	0.382	11.4 nmol	1 : 5.67
2.01 nmol	0.392	11.7 nmol	1 : 5.82
2.35 nmol	0.452	13.5 nmol	1 : 5.74

Tabelle 4.2: Bestimmung des Eisengehaltes der rekonstituierten AlbA^{C129A C133A C136A}-Variante.

n (AlbA ^{C129A C133A C136A})	OD ₅₉₃	n (Fe ³⁺)	Verhältnis AlbA ^{C129A C133A C136A} :Fe ³⁺
1.61 nmol	0.292	8.73 nmol	1 : 5.42
2.14 nmol	0.362	10.8 nmol	1 : 5.05
2.14 nmol	0.356	10.6 nmol	1 : 4.95
2.68 nmol	0.475	14.2 nmol	1 : 5.30
2.68 nmol	0.451	13.5 nmol	1 : 5.04
3.21 nmol	0.562	16.8 nmol	1 : 5.23

Die Eisengehalte der Mutanten wurden jeweils sechsmal bestimmt. Aus den Messwerten ergeben sich ein durchschnittlicher Eisengehalt für AlbA^{C129A} von 5.77 ± 0.05 Äquivalenten und ein durchschnittlicher Eisengehalt für AlbA^{C129A C133A C136A} von 5.17 ± 0.15 Äquivalenten.

4.1.4 Bestimmung der SAM-Spaltungsaktivität von AlbA

Wie in Kapitel 1.3 erläutert, ist das charakteristische Merkmal aller Radical SAM Enzyme die reduktive Spaltung von SAM in Methionin und das 5'-dA-Radikal. Wird die Reaktion ohne das zweite Enzymsubstrat durchgeführt, bildet sich 5'-Deoxyadenosin, da das gebildete Radikal in diesem Fall mit verschiedenen Komponenten aus seiner Umgebung, wie z. B. Protein oder Lösungsmittel, reagiert (Abbildung 4.3) (Chatterjee et al., 2008; Duschene and Broderick, 2010). Die Bildung von 5'-Deoxyadenosin und Methionin in einem SAM-Spaltungsaktivitätsassay kann mittels HPLC-MS detektiert werden. Dadurch lässt sich unwiderruflich beweisen, dass es sich bei dem untersuchten Protein um ein Radical SAM Enzym handelt.

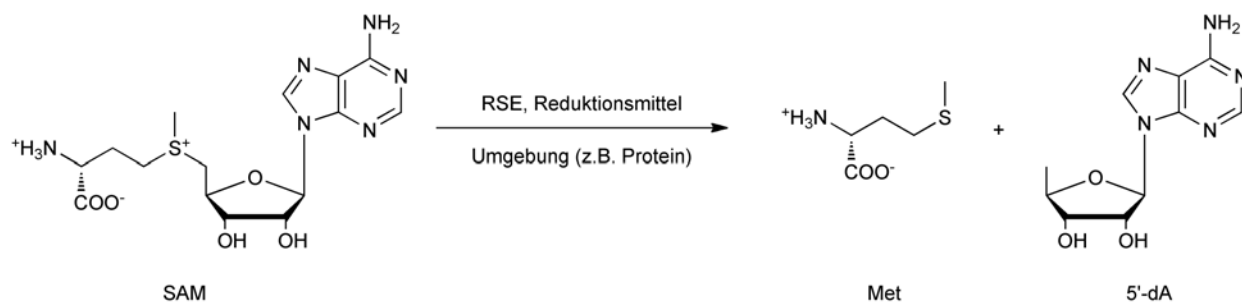


Abbildung 4.3: Überblick über die von Radical SAM Enzymen katalysierte SAM-Spaltung unter reduktiven Bedingungen. Das zunächst gebildete 5'-dA-Radikal reagiert bei Abwesenheit des zweiten Substrats mit der Umgebung zu 5'-Deoxyadenosin.

Zur Untersuchung der SAM-Spaltungsaktivität wurden vier verschiedene Assayzusammensetzungen getestet. Der jeweilige Assay wurde nach jeweils vierständiger Inkubation gestoppt und mittels analytischer HPLC-MS untersucht (Abbildung 4.4). In der ersten Kontrollreaktion (Chromatogramm IV) wurde SAM mit Natriumdithionit unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Kontrolle 2 wurde mit SAM und rekonstituiertem AlbA, aber ohne Reduktionsmittel, durchgeführt (Chromatogramm III). Die dritte Kontrollreaktion wurde mit SAM, Natriumdithionit als Reduktionsmittel und nicht rekonstituiertem AlbA durchgeführt (Chromatogramm II). Für die eigentliche Reaktion (Chromatogramm I) wurden SAM, Natriumdithionit und rekonstituiertes AlbA verwendet.

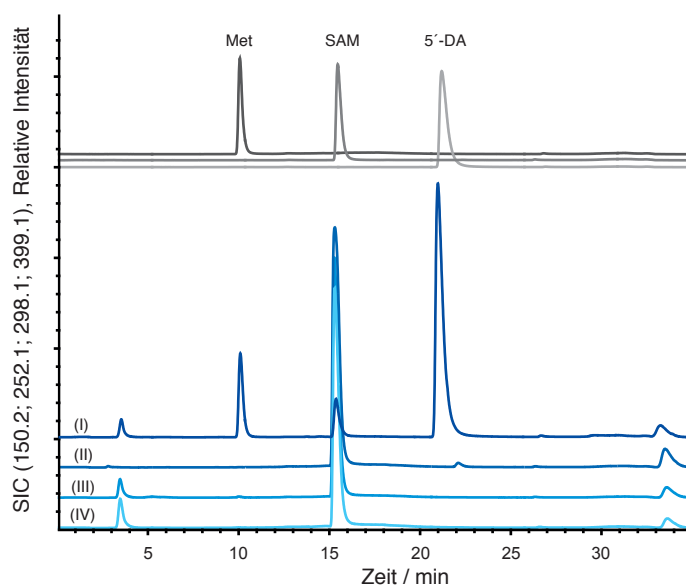


Abbildung 4.4: Single-Ion-Chromatogramme (SICs) der SAM-Spaltungsaktivitätsassays mit AlbA. Die grauen Chromatogramme entsprechen Standards von Methionin (Met), SAM, und 5'-Deoxyadenosin (5'-dA). Die blauen Chromatogramme zeigen die HPLC-MS-Analysen der verschiedenen Assayzusammensetzungen.

In den Kontrollen 1 und 2 ist keine Bildung von Methionin und 5'-Deoxyadenosin zu beobachten. In Anwesenheit von nicht rekonstituiertem AlbA und Reduktionsmittel wurden sehr kleine Mengen 5'-dA gebildet. Nur bei Verwendung des rekonstituierten Enzyms in Anwesenheit von Reduktionsmittel ist die Bildung von hohen Mengen an Met und 5'-dA zu beobachten. Die Analyse des UV-Peaks von 5'-dA bei einer Wellenlänge von 260 nm ergab, dass nach vierstündiger Inkubation ca. 8 von den eingesetzten 15 Äquivalenten SAM in 5'-dA umgesetzt wurden.

4.1.4.1 Bestimmung der SAM-Spaltungsaktivität von AlbA in Anwesenheit von DMSO

Das Subtilosin A Vorläuferpeptid SboA ist in Wasser unlöslich, besitzt aber in DMSO eine sehr hohe Löslichkeit. Um Vorläuferpeptidmodifikationsassays durchführen zu können, wurde daher die SAM-Spaltungsaktivität von rekonstituiertem AlbA in geringen DMSO-Konzentrationen getestet. Die Ergebnisse wurden der Diplomarbeit von Leif Flühe entnommen (Abbildung 4.5) (Flühe, 2010).

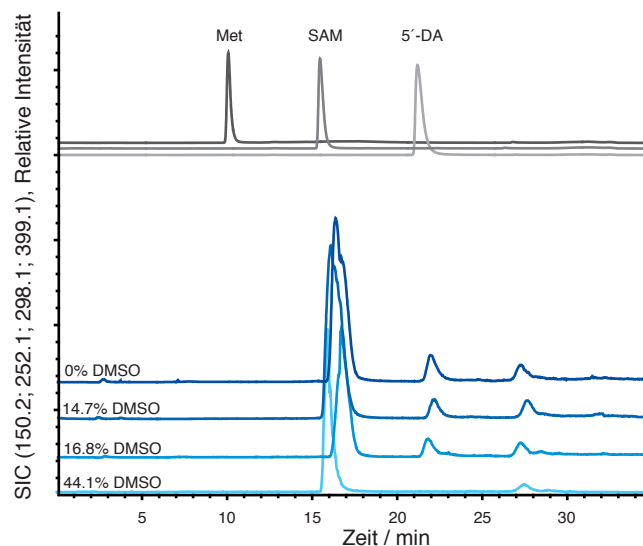


Abbildung 4.5: *Single-Ion-Chromatogramme (SICs) der SAM-Spaltungsaktivitätsassays bei verschiedenen DMSO-Konzentrationen (blau). Die grauen Chromatogramme zeigen Standards von Met, SAM und 5'-dA. Die SAM-Spaltungsaktivitätsassays wurden noch nach einem alten Protokoll durchgeführt (Flühe, 2010). Daher ist auch bei Abwesenheit von DMSO nur die Spaltung von einem Äquivalent SAM zu beobachten.*

Es ist zu beobachten, dass die SAM-Spaltungsaktivität von rekonstituiertem AlbA mit zunehmender DMSO-Konzentration abnimmt. Bei einer DMSO-Konzentration von 16.8% zeigt rekonstituiertes AlbA noch eine für die Vorläuferpeptidmodifikationsassays ausreichende Spaltungsaktivität, die bei einem DMSO-Gehalt von 44.1% nicht mehr zu beobachten ist. Löslichkeitsuntersuchungen zeigten, dass sich SboA in 16% DMSO in ausreichenden Mengen lösen lässt. Die SboA-Modifikationsassays wurden daher mit einem DMSO-Gehalt von 16% durchgeführt.

4.1.5 Bestimmung der SAM-Spaltungsaktivität von den AlbA-Varianten

Die SAM-Spaltungsaktivität von den AlbA-Mutanten AlbA^{C129A C133A C136A}, AlbA^{C129A}, AlbA^{C133A} und AlbA^{C136A} wurde untersucht, um zu überprüfen, ob die drei Cysteine innerhalb des CXXXCXXC-Motivs an der Koordination des für die SAM-Spaltung benötigten [4Fe-4S]-Clusters beteiligt sind. Die Ergebnisse der HPLC-MS-Analyse der Assays sind in Abbildung 4.6 gezeigt.

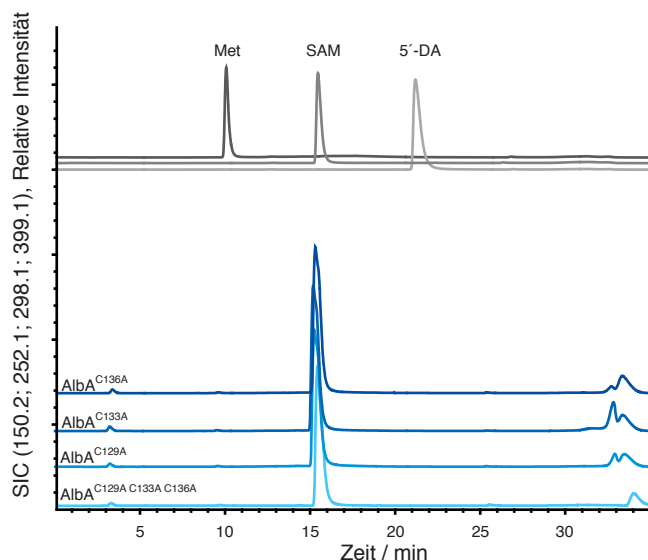


Abbildung 4.6: *Single-Ion* Chromatogramme (SICs) der SAM-Spaltungsaktivitätsassays der vier untersuchten AlbA-Varianten (blau). Die grauen Chromatogramme zeigen Standards von Met, SAM und 5'-dA.

Keiner der untersuchten rekonstituierten Mutanten ist mehr in der Lage, SAM reduktiv in Methionin und 5'-dA zu spalten. Die drei Cysteinreste des CXXXCXXC-Motivs sind demnach für die Koordination des für die Generierung des 5'-dA-Radikals benötigten Fe/S-Clusters verantwortlich.

4.1.6 Spektroskopische Charakterisierung der in AlbA gebundenen Fe/S-Cluster

Der für AlbA bestimmte Eisen- und Schwefelgehalt von 7.2 ± 0.3 bzw. 7.7 ± 0.4 Äquivalenten und der für die AlbA^{C129A C133A C136A}-Variante bestimmte Eisengehalt von 5.17 ± 0.15 lässt vermuten, dass das Protein über mehr als einen Fe/S-Cluster, der über das für Radical SAM Enzyme typische CXXXCXXC-Motiv koordiniert ist, verfügt. Zur Charakterisierung der möglichen Fe/S-Cluster wurde AlbA mittels UV-Vis- und EPR-Spektroskopie charakterisiert (Abbildung 4.7).

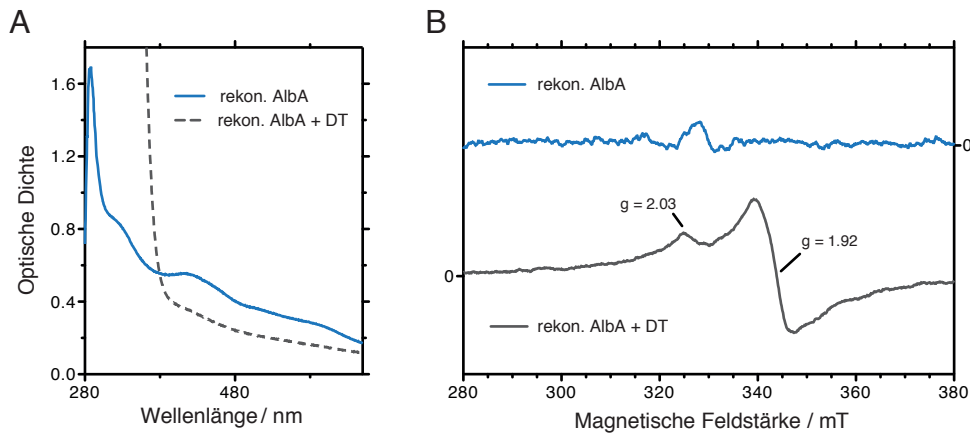


Abbildung 4.7: Spektroskopische Charakterisierung von rekonstituiertem AlbA. (A) UV-Vis-Spektren von reduziertem (grau) und nicht reduziertem (blau), jeweils rekonstituiertem AlbA. Im Spektrum des oxidierten Enzyms sind Absorptionsbanden bei 325 nm und 410 nm zu beobachten. (B) EPR-Spektren von reduziertem (grau) und nicht reduziertem (blau), jeweils rekonstituiertem AlbA. Das Spektrum von reduziertem AlbA zeigt EPR-Signale bei $g = 2.03$ und $g = 1.92$.

Das UV-Vis-Spektrum von nicht reduziertem AlbA (Abbildung 4.7a) zeigt die für Fe/S-Clusterhaltige Proteine typischen Absorptionsbanden bei 325 nm und 410 nm (Hagen and Watson, 1983; Külzer et al., 1998). Die Bande bei 410 nm ist charakteristisch für [4Fe-4S]-Cluster, während z. B. [2Fe-2S]-Cluster eine typische Absorptionsbande bei 460 nm besitzen (Ugulava et al., 2000). Das UV-Vis-Spektrum von reduziertem AlbA zeigt keine spezifischen Absorptionsbanden. Im Gegensatz dazu ist reduziertes AlbA EPR-aktiv (Abbildung 4.7b) und zeigt deutliche Signale bei $g = 2.03$ und $g = 1.92$. Diese gemessenen g -Werte sind charakteristisch für [4Fe-4S]⁺-Cluster-enthaltende Proteine (Sweeney and Rabinowitz, 1980). Im nicht reduzierten Zustand zeigt AlbA keine charakteristische Absorptionsbande. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass AlbA nur [2Fe-2S]- und [4Fe-4S]-Cluster besitzt, da [4Fe-4S]²⁺- und [2Fe-2S]²⁺-Cluster diamagnetisch sind, d. h. keine ungepaarten Elektronen besitzen, und daher EPR-inaktiv sind (Sweeney and Rabinowitz, 1980). Um die genaue Konstitution eines zweiten in AlbA gebundenen Fe/S-Clusters zu bestimmen, wurde die rekonstituierte AlbA-Mutante AlbA^{C129A C133A C136A}, in der die drei Cysteinereste, die den ersten [4Fe-4S]-Cluster koordinieren, durch Alanin ersetzt wurden, ebenfalls mittels UV-Vis- und EPR-Spektroskopie untersucht (Abbildung 4.8). Ein um ca. 3 Äquivalente reduzierter Eisengehalt und die Tatsache, dass das Enzym nicht mehr die SAM-Spaltung in Met und 5'-dA katalysiert, zeigen, dass die Entfernung des durch das CXXXCXXC-Motiv gebundenen [4Fe-4S]-Clusters erfolgreich war.

Wie schon im UV-Vis Spektrum (Abbildung 4.8a) von nicht reduziertem AlbA sind im Spektrum von nicht reduziertem AlbA^{C129A C133A C136A} Absorptionsbanden bei 325 nm und 410 nm zu beobachten, die typisch für [4Fe-4S]-Cluster sind. Dieser Sachverhalt deutet darauf hin, dass AlbA einen zweiten [4Fe-4S]-Cluster besitzt. Im reduzierten Zustand sind keine spezifischen Absorp-

tionsbanden zu beobachten. Die reduzierte Form ist hingegen EPR-aktiv (Abbildung 4.8b) und zeigt ein Spektrum mit Signalen bei $g = 2.02$ und $g = 1.92$, die charakteristisch für $[4\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster sind. Unter Umständen kann ein im Protein gebundener $[2\text{Fe-2S}]^+$ -Cluster ein sehr ähnliches Signal besitzen. Daher wurde zusätzlich die Temperaturabhängigkeit der Intensität des EPR-Signals bei $g = 1.92$ bestimmt (Abbildung 4.9).

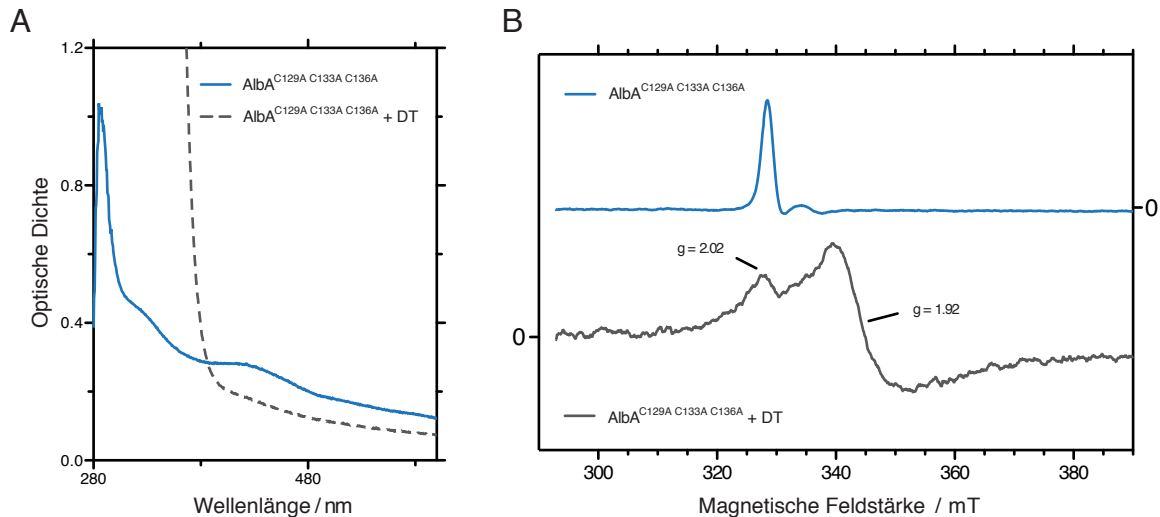


Abbildung 4.8: Spektroskopische Charakterisierung der rekonstituierten AlbA-Variante $\text{AlbA}^{\text{C129A C133A C136A}}$. (A) UV-Vis-Spektren von reduziertem (grau) und nicht reduziertem (blau), jeweils rekonstituiertem $\text{AlbA}^{\text{C129A C133A C136A}}$. Im Spektrum des oxidierten Enzyms sind Absorptionsbanden bei 325 nm und 410 nm zu beobachten. (B) EPR-Spektren von reduziertem (grau) und nicht reduziertem (blau), jeweils rekonstituiertem $\text{AlbA}^{\text{C129A C133A C136A}}$. Das Spektrum der reduzierten AlbA-Variante zeigt EPR-Signale bei $g = 2.02$ und $g = 1.92$.

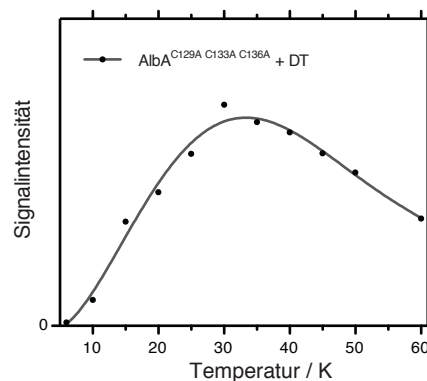


Abbildung 4.9: Temperaturabhängigkeit der Intensität des EPR-Signals der reduzierten $\text{AlbA}^{\text{C129A C133A C136A}}$ -Variante bei $g = 1.92$. Das Signal hat die maximale Intensität bei 30 K.

Die maximale Intensität wird bei 30 K erreicht. Dieser Wert ist charakteristisch für einen $[4\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster. $[2\text{Fe-2S}]^+$ -Cluster haben ein maximales EPR-Signal bei einer Temperatur von 60 K bis 70 K (Ugulava et al., 2001a). AlbA verfügt demnach über einen zweiten $[4\text{Fe-4S}]$ -Cluster. Im nicht reduzierten Zustand ist der diamagnetische $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster EPR-inaktiv. Das EPR-

Spektrum (Abbildung 4.8b) zeigt jedoch ein Spektrum mit einem Signal bei $g = 2.01$. Dieses Signal ist einem $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster zuzuordnen, der sich durch Degradation aus einem $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster bilden kann (Duschene and Broderick, 2010). Der zweite in AlbA befindliche $[4\text{Fe-4S}]$ -Cluster könnte daher wie der erste Fe/S-Cluster über drei Cysteinreste koordiniert sein.

4.1.7 Massenanalytik des Subtilosin A Vorläuferpeptids SboA

Das von der Peptide Speciality Laboratories GmbH (Heidelberg) synthetisierte Subtilosin A Vorläuferpeptid SboA wurde zunächst massenspektrometrisch untersucht (Abbildung 4.10). Dafür wurden 50 μL einer 100 μM SboA-Lösung in 20% DMSO injiziert, da SboA in Wasser unlöslich ist.

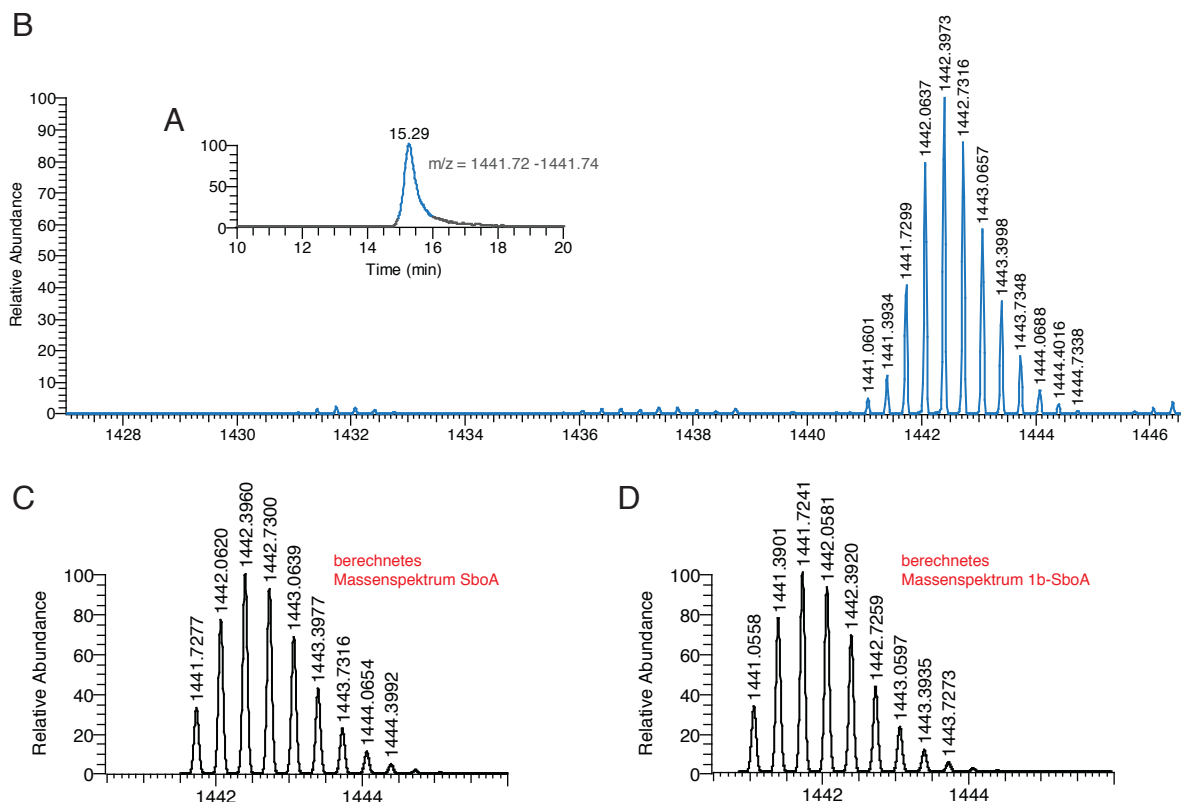


Abbildung 4.10: HPLC-HRMS-Analyse des Subtilosin A Vorläuferpeptids SboA. (A) Extrahiertes Ionenchromatogramm der SboA-Lösung. (B) Massenspektrum des in (A) blau markierten extrahierten Peaks. Die Isotopenverteilung zeigt, dass das Spektrum einer dreifach geladenen Verbindung zuzuordnen ist. (C) Durch den Qual-Browser berechnetes Massenspektrum von dreifach protoniertem und geladenem SboA. (D) Berechnetes Massenspektrum von dreifach protoniertem und geladenem, einfach verbrücktem SboA.

Das extrahierte Ionenchromatogramm der Masse von dreifach geladenem SboA zeigt einen Peak mit einer Retentionszeit (t_R) von 15.3 min. Dem zugehörigen Massenspektrum der Verbindung ist aber nicht das berechnete Masse zu Ladungsverhältnis von $[M+3H]^{3+} = 1441.7277$ zuzuordnen, sondern $[M+3H]^{3+} = 1441.0601$. Daraus ergibt sich eine auf die dekonvolutionierte

Masse berechnete Differenz von 2.093 Da. Auf Grund der Tatsache, dass SboA über drei Cysteinreste verfügt, wurde vermutlich in den oxidativen Bedingungen innerhalb der Lösung eine Disulfidbrücke ausgebildet, die zu einem Masseverlust von 2.016 Da führt. Das berechnete Massenspektrum eines einfach verbrückten SboA-Derivats (1b-SboA; Abbildung 4.10d) stimmt aber mit dem beobachteten nicht überein. Vielmehr ist das aufgezeichnete Massenspektrum eine Überlagerung der Massenspektren von SboA (Abbildung 4.10c) und 1b-SboA. Es hat demnach eine partielle Oxidation der Cysteinreste zu einer Disulfidbrücke stattgefunden. Ebenfalls ist zu beobachten, dass die unterschiedlichen SboA-Spezies durch den verwendeten Lösungsmittelgradienten nicht voneinander getrennt werden. Aus diesem Grund wurde der hier verwendete Standardgradient weiter verbessert. Für zukünftige Analysen wurde das in den Methoden beschriebene Programm benutzt.

Um die in den Assays mindestens zu einsetzende SboA-Konzentration zu bestimmen, wurden HPLC-HRMS-Analysen von SboA-Lösungen verschiedener Konzentrationen durchgeführt (Abbildung A.2). Es zeigt sich, dass SboA ab einer Konzentration von 80 μ M sehr gut nachweisbar ist.

4.1.8 Bestimmung der von AlbA katalysierten Modifikationen an SboA

In Kapitel 4.1.7 wurde gezeigt, dass innerhalb einer DMSO-enthaltenden SboA-Lösung, eine teilweise Oxidation der Cysteinreste zu Disulfidbrücken stattfindet. Der dabei auftretende Massenshift von 2.016 Da ist identisch mit der zu erwarteten Massendifferenz von ebenfalls 2.016 Da, die bei der Bildung eines Thioethers auftritt. Deswegen kann zwischen der Bildung eines Thioethers und einer Disulfidbrücke mittels Massenspektrometrie nicht unterschieden werden. Daher wurden Assays und Kontrollen durchgeführt, zu denen nach der Reaktionszeit unter anaeroben Bedingungen Iodacetamid gegeben wurde. Das Iodacetamid carbamidomethyliert von AlbA nicht modifizierte Cysteinreste und verhindert so die Disulfidbrückenbildung unter aeroben Bedingungen. Dadurch ist eindeutig zwischen Thioether-verbrückten und nicht modifizierten Cysteinresten zu unterscheiden (Abbildung 4.11). Zusätzlich wurden die Assays mit Methanol extrahiert, um das Peptid von AlbA und DMSO zu trennen. Das so gewonnene und an der Speedvac getrocknete Extrakt wurde zur HPLC-MS-Analyse in Methanol, das 1 mM TCEP enthielt, gelöst, um eine mögliche Disulfidbrückenbildung zu verhindern. Obwohl SboA ab einer Konzentration von 80 μ M gut nachweisbar ist, wurde in den Assays eine Konzentration von 200 μ M verwendet, weil es während der Methanolextraktion zu Verlusten kommen konnte.

Um die enzymatische Aktivität von rekonstituiertem AlbA¹ gegenüber dem Subtilosin A Vorläuferpeptid SboA zu analysieren wurden fünf verschiedene Assays durchgeführt (Abbildungen 4.12 und A.3): 1.) die Kontrollreaktion ohne Enzym; 2.) die Kontrollreaktion ohne Enzym mit Zugabe von Iodacetamid; 3.) der eigentliche Assay; 4.) der eigentliche Assay mit Zugabe von Iodacetamid und 5.) eine Kontrollreaktion ohne Zugabe von SAM, aber mit Zugabe von Iodacetamid nach 5 h Reaktionszeit.

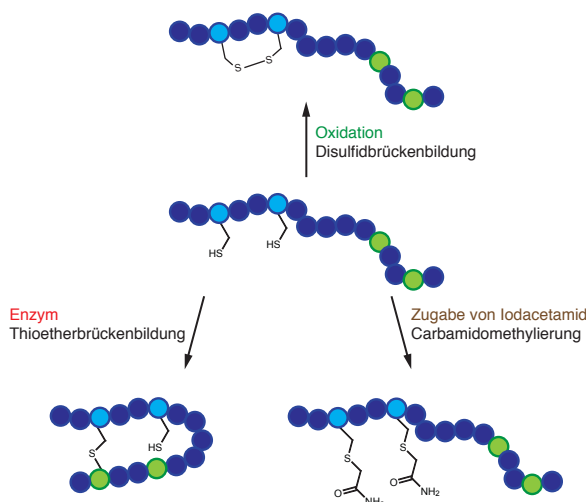


Abbildung 4.11: Strategie, um per massenspektrometrischer Analyse zwischen der Bildung eines Thioethers und einer Disulfidbrücke zu unterscheiden. Während der Vorbereitung für die HPLC-MS-Analyse ist die Probe oxidativen Bedingungen ausgesetzt. Nicht modifizierte Cysteinreste können in diesen Bedingungen Disulfidbrücken ausbilden. Diese Modifikation ist massenspektrometrisch nicht von der Thioetherbrückenbildung zu unterscheiden. Die Unterscheidung zwischen von AlbA modifizierten und nicht modifizierten Cysteinresten gelingt durch die Zugabe von Iodacetamid nach dem Assay unter anaeroben Bedingungen. Nicht modifizierte Cysteinreste werden carbamidomethyliert und können somit keine Disulfidbrücken mehr ausbilden.

In der Kontrollreaktion wurde, wie erwartet, die dreifach positiv geladene nicht modifizierte SboA-Spezies, die ein berechnetes m/z -Verhältnis von $[M+3H]^{3+} = 1441.7281$ besitzt, mit einer Retentionszeit von $t_R = 18.8$ min detektiert (Abbildung 4.12a&e). Durch Verwendung der 1 mM TCEP-Lösung wurde eine Disulfidbrückenbildung während der Probenvorbereitung erfolgreich verhindert. Wurde die Kontrollreaktion mit Iodacetamid versetzt, war eine SboA-Spezies mit einer Retentionszeit von $t_R = 17.9$ min und einem m/z -Verhältnis von $[M+3H]^{3+} = 1498.7732$ zu detektieren (Abbildung 4.12b&e). Dies ist in Übereinstimmung mit dem berechneten m/z -Verhältnis von dreifach durch Iodacetamid modifiziertem SboA von $[M+3H]^{3+} = 1498.7496$. Wird im Assay AlbA zugesetzt, verändert sich die Retentionszeit der detektierten SboA-Spezies auf 21.2 min. Das m/z -Verhältnis ändert sich ebenfalls auf $[M+3H]^{3+} = 1439.7335$ (Abbildung

¹ Falls im restlichen Ergebnisteil von AlbA die Rede ist, bezieht es sich immer auf das rekonstituierte Enzym, da alle weiteren Vorläuferpeptidmodifikationsassays mit aktiven und somit rekonstituierten AlbA durchgeführt wurden.

4.12c&e). Bezogen auf die dekonvoluierten Massen ergibt sich ein Massenverlust von 6.062 Da im Vergleich zu unverbrückten SboA, dass in der Kontrolle nachgewiesen wurde. Wurde der Assay mit Iodacetamid versetzt (Abbildung 4.12d&e) wurde erneut die SboA-Spezies mit einer Retentionszeit von 21.2 min und einem m/z-Verhältnis von $[M+3H]^{3+} = 1439.7344$ detektiert. Auf Grund der Tatsache, dass die Cysteinreste nicht mehr von Iodacetamid modifiziert werden konnten, wurden diese von AlbA modifiziert. Die gemessene Massendifferenz von 6.062 Da im Vergleich zur Kontrolle legt nahe, dass AlbA die Synthese von drei Thioetherbrücken katalysiert hat, was zu einer berechneten Massendifferenz von 6.048 Da – 2.016 Da pro Thioetherbrücke – führt. Bei der im Assay detektierten SboA-Spezies handelt es sich daher vermutlich um dreifach verbrücktes SboA (3b-SboA), das ein berechnetes m/z-Verhältnis von $[M+3H]^{3+} = 1439.7125$ besitzt.

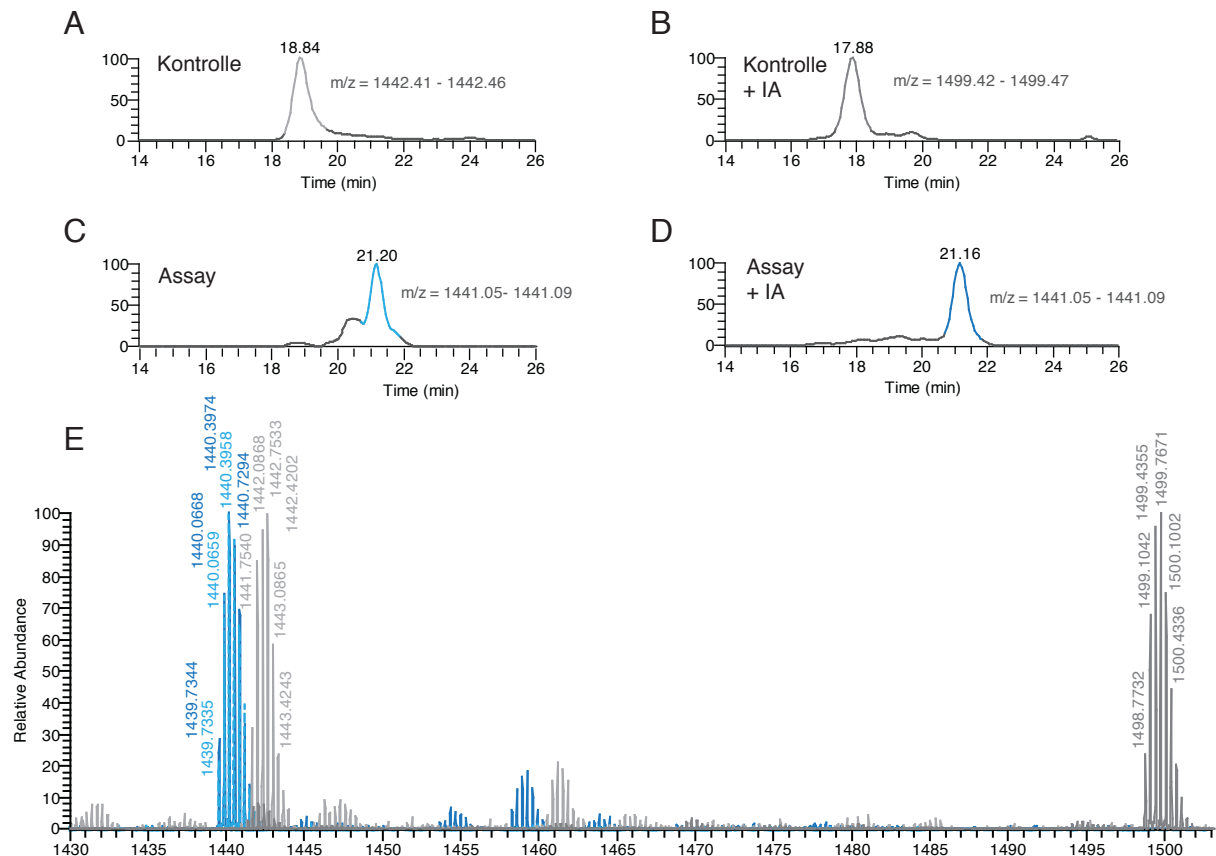


Abbildung 4.12: HPLC-HRMS-Analyse der durchgeführten SboA-Modifikationsassays. (A) Extrahiertes Ionenchromatogramm der Kontrolle. Die extrahierte Masse ist jeweils mit angegeben. (B) Extrahiertes Ionenchromatogramm der Kontrolle ohne Iodacetamidzugabe (+IA). (C) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Assays mit AlbA. (D) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Assays mit AlbA und nach Zugabe von Iodacetamid. (E) Massenspektren der Peaks in den extrahierten Ionenchromatogrammen. Die Massenspektren sind farblich mit den in (A) bis (D) gezeigten Peaks verknüpft.

Zusätzlich wurde noch ein Kontrollassay ohne SAM und mit Zugabe von Iodacetamid durchgeführt (Abbildung A.3). Dabei ist eine SboA-Spezies mit einer Retentionszeit von 17.7 min und einem m/z-Verhältnis von $[M+3H]^{3+} = 1498.7665$ zu beobachten. Hierbei handelt es sich um dreifach carbamidomethyliertes SboA, das ebenfalls in der Kontrolle ohne AlbA mit Iodacetamidzugabe zu detektieren war.

4.1.9 Untersuchung der Regiospezifität von AlbA mit Hilfe von Thermolysin

In den SboA-Modifikationsassays wurde eine voraussichtlich dreifach verbrückte SboA-Spezies identifiziert. Um diese weiter zu charakterisieren, insbesondere das Vorhandensein und die Lage von Thioetherbrücken, wurde sie mit Hilfe eines Thermolysinverdaus analysiert. Thermolysin ist eine relativ spezifische Protease, die vor den Aminosäuren Ala, Phe, Ile, Leu, Met oder Val schneidet, nicht aber nach Asp oder Glu (Keil, 1992). Für Subtilisin A wurde gezeigt, dass trotz elf Schnittstellen nur fünf Hauptfragmente gebildet werden (Babasaki et al., 1985). Darauf basierend wurden die möglichen Fragmente, die beim Thermolysinverdaus von dreifach thioetherverbrücktem SboA zu erwarten sind, berechnet (Abbildung 4.13).

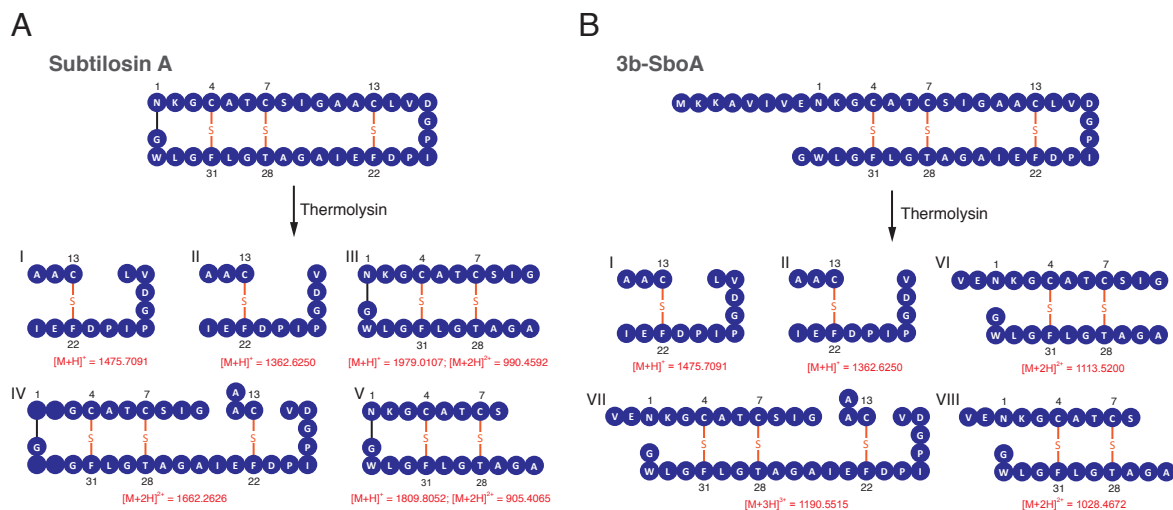


Abbildung 4.13: Peptidfragmente, die beim Thermolysinverdaus von Subtilisin A und 3b-SboA zu erwarten sind. (A) Der Thermolysinverdaus von Subtilisin A liefert die hier gezeigten fünf Hauptfragmente (Babasaki et al., 1985). (B) Voraussichtliche Fragmente des Thermolysinverdaus von 3b-SboA. Auf Grund der fehlenden Abspaltung des Leaderpeptids und der Zyklisierung in 3b-SboA sind nur zwei der fünf Peptidfragmente identisch. Diese zwei Fragmente enthalten die Thioetherbrücke zwischen Cys13 und Phe22.

Um die Ergebnisse von Babasaki *et al.* zu bestätigen, wurde gereinigtes Subtilisin A mit Thermolysin für 75 h nach einem an das 1985 veröffentlichte angepasste Protokoll verdaut. Die Ergebnisse der HPLC-HRMS-Analyse des Verdaus sind in den Abbildungen 4.14a&b und A.4 gezeigt. Es konnten alle zu erwarteten Peptidfragmente nachgewiesen werden. Dabei zeigten

die Fragmente II, III und V eine um den Faktor 80 bzw. 10 höhere Intensität als die Fragmente I und IV. Dies ist damit zu erklären, dass die Fragmente I und IV von Thermolysin weiter zu den Peptidfragmenten II, III und V verdaut werden können. Im Verdau des Produktes der Reaktion von SboA mit AlbA konnte eins der zu erwarteten fünf Fragmente nachgewiesen werden (Abbildungen 4.14c&d und A.5). Dabei handelt es sich um Fragment II mit einem m/z -Verhältnis von $[M+H]^+ = 1362.6264$. Im Vergleich zu Fragment II aus dem Subtilisin A-Verdau ist die Intensität des Signals um den Faktor 5000 geringer und liegt nur minimal über der Detektionsgrenze. Die Fragmente I, VI, VII und VIII konnten nicht detektiert werden, weil ihre Intensität mindestens um den Faktor 5 unter der von Fragment II liegt. Somit wären sie auch theoretisch nicht mehr mit dem verwendeten Massenspektrometer detektierbar.

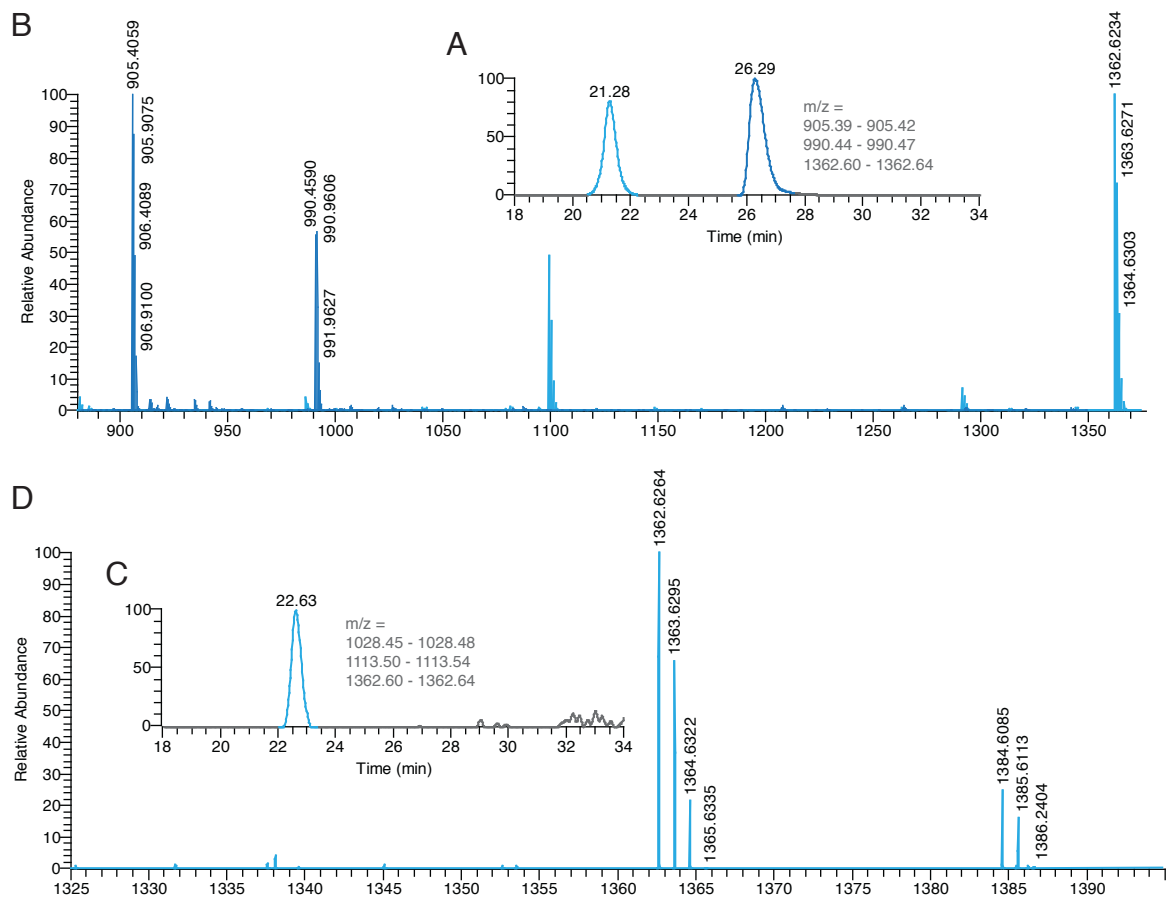


Abbildung 4.14: HPLC-HRMS-Analyse der Thermolysinverdau von Subtilisin A und des Produktes der Reaktion von SboA und AlbA. (A) Extrahiertes Ionenchromatogramm der HPLC-HRMS-Analyse des Subtilisin A-Verdau. Es wurden die m/z -Verhältnisse von Fragment II, III und V extrahiert. (B) Massenspektren der beiden in (A) detektierten Peaks mit Retentionszeiten von 21.3 min und 26.3 min. Bei der Verbindung mit der Retentionszeit von 21.3 min handelt es sich um Fragment II mit einem m/z -Verhältnis von $[M+H]^+ = 1362.6234$. Bei der Retentionszeit von 26.3 min eluieren die Fragmente II und V mit m/z -Verhältnissen von $[M+2H]^{2+} = 990.4590$ bzw. $[M+2H]^{2+} = 905.4059$. (C) Extrahiertes Ionenchromatogramm der HPLC-HRMS-Analyse des 3b-SboA-Verdau. Es wurden die m/z -Verhältnisse der Fragmente II, VI und VII extrahiert. Im Gegensatz zum Subtilisin A-Verdau ist nur ein Peak mit einer Retentionszeit von 22.6 min zu beobachten. (D) Massenspektrum der Verbindung mit einer Retentionszeit von 22.6 min. Hierbei handelt es sich um Fragment II mit einem m/z -Verhältnis von $[M+H]^+ = 1362.6264$.

Das Fragment II des 3b-SboA-Verdaus beinhaltet voraussichtlich die Thioetherbrücke zwischen Cys13 und Phe31. Da sich aber dessen Retentionszeit von 22.6 min um 1 min von der t_R von Fragment II des Subtilosin A-Verdaus unterscheidet, wurden beide Fragmente mittels MS-MS analysiert, um die Regiospezifität von AlbA zu überprüfen (Abbildung 4.15). Es zeigt sich, dass beide Fragmente ein fast identisches Fragmentierungsspektrum besitzen und somit über die gleiche Konnektivität verfügen. Bei dem Produkt der Reaktion von SboA und AlbA handelt es sich definitiv um die dreifach thioetherverbrückte SboA-Spezies. Die Generierung des Thioethers zwischen Cys13 und Phe22 ist dabei regiospezifisch. Die Regiospezifität der restlichen zwei Thioetherbrücken konnte über die Methode nicht bestimmt werden. Sie wurde über *in vivo*-Studien, in denen die Produktion von Subtilosin A-Varianten untersucht wurde, überprüft (Kapitel 4.1.16).

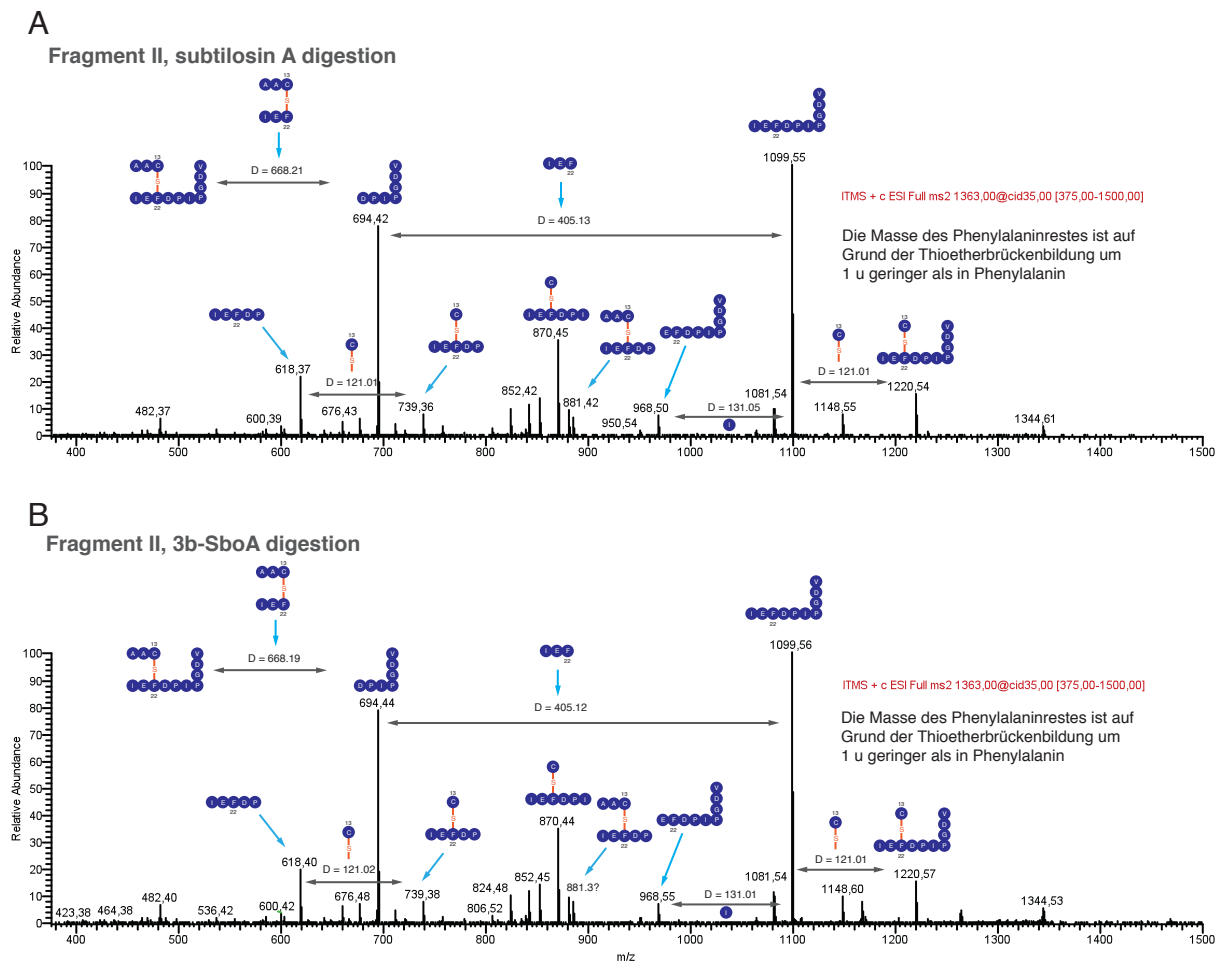


Abbildung 4.15: MS-MS-Spektren der bei den verschiedenen Thermolysinverdauen erhaltenen Fragmente II. (A) MS-MS-Spektrum von Fragment II des Subtilosin A-Verdaus. (B) MS-MS-Spektrum des Thermolysinverdaus von Fragment II des Produktes der Reaktion von SboA mit AlbA. Die Spektren sind identisch, was beweist, dass AlbA die Synthese der Thioetherbrücken katalysiert und die Thioetherbrücke zwischen Cys13 und Cys22 regiospezifisch gebildet wird.

4.1.10 Carboxypeptidaseverdau der dreifach verbrückten SboA-Spezies

Durch den Thermolysinverdau von 3b-SboA konnte nur die regiospezifische Synthese der Thioetherbrücke zwischen Cys13 und Phe22 nachgewiesen werden. Um weitere Aussagen über die Regiospezifität der von AlbA katalysierten Reaktion machen zu können, wurde 3b-SboA mit einem Mix aus Carboxypeptidase A und B verdaut (Abbildungen 4.15 und A.6).

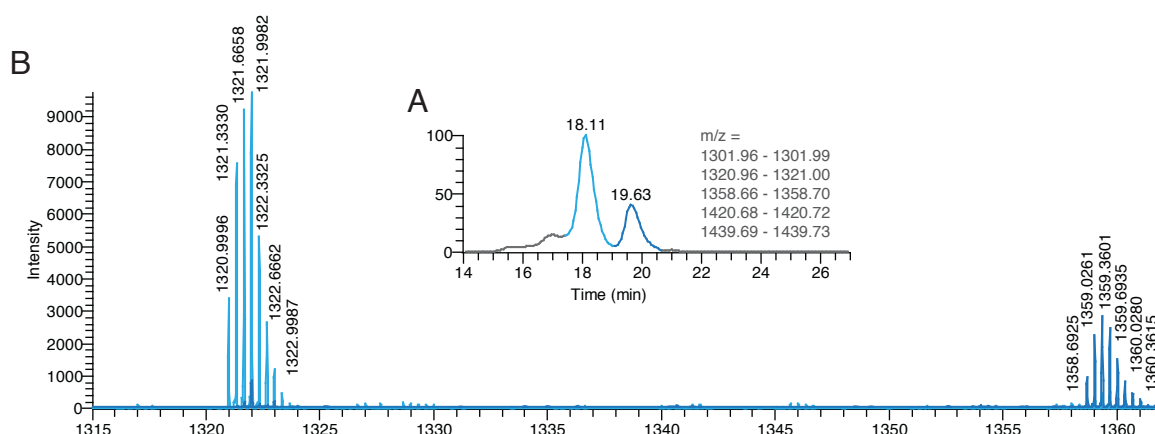


Abbildung 4.16: HPLC-HRMS-Analyse des Carboxypeptidaseverdau von 3b-SboA. (A) Extrahiertes Ionenchromatogramm mit den m/z-Verhältnissen von 1-fach, 2-fach, 3-fach, 4-fach und nicht verkürzten 3b-SboA. Es sind zwei Peaks zu identifizieren. (B) Massenspektren der Verbindungen der Peaks, die in (A) nachgewiesen wurden. Die 2-fach verkürzte 3b-SboA-Variante hat eine um den Faktor 3 geringere Intensität als die 3-fach verbrückte 3b-SboA-Variante.

Aus der HPLC-HRMS-Analyse des Verdau wurden die m/z-Verhältnisse von 1-fach, 2-fach, 3-fach, 4-fach und nicht verkürzten 3b-SboA extrahiert. Es sind zwei Peaks mit Retentionszeiten von 18.1 min bzw. 19.6 min zu identifizieren (Abbildung 4.16a). Dem von der Intensität größeren Peak ist dabei dreifach verkürztes 3b-SboA mit einem m/z-Verhältnis von $[M+3H]^{3+} = 1320.9996$ ($[M+3H]^{3+}_{\text{berechnet}} = 1320.9842$) zuzuordnen. Zweifach verkürztes 3b-SboA eluiert bei 19.6 min ($[M+3H]^{3+} = 1358.6925$; $[M+3H]^{3+}_{\text{berechnet}} = 1358.6789$) und besitzt eine um den Faktor von ca. 3 geringere Intensität. Die detaillierten Massenspektren der beiden Verbindungen sind in Abbildung A.6 zu finden. Kürzere oder längere 3b-SboA-Fragmente wurden im Verdauassay nicht gefunden. In Kontrollverdauen, die mit unverbrücktem SboA durchgeführt wurden, konnten weder SboA noch die 1-fach, 2-fach, 3-fach oder 4-fach verkürzte Variante nachgewiesen werden.

4.1.11 Vorläuferpeptidmodifikationsassays mit SboA-Varianten

Um Rückschlüsse auf die Reihenfolge der von AlbA katalysierten Thioetherbrückenbildung ziehen zu können, wurden Modifikationsassays mit den drei SboA-Varianten SboA^{C4A}, SboA^{C7A} und SboA^{C13A} durchgeführt, bei denen jeweils ein Cysteinrest durch Alanin ausgetauscht ist. Wie bei SboA wurden für jedes Vorläuferpeptid fünf verschiedene Assays durchgeführt. Die Ergebnisse der HPLC-HRMS-Analyse der SboA^{C13A}-Mutante sind in den Abbildungen 4.17 und A.8 gezeigt. In der Kontrolle wurde wie erwartet nicht modifiziertes SboA^{C13A} mit einem m/z-Verhältnis von $[M+3H]^{3+} = 1431.0840$ ($[M+3H]^{3+}_{\text{berechnet}} = 1431.0708$) identifiziert. Wurde das nicht modifizierte SboA^{C13A} mit Iodacetamid versetzt, wurde die Carbamidomethylierung der beiden Cysteinreste beobachtet. Es resultierte eine Verbindung mit einem m/z-Verhältnis von $[M+3H]^{3+} = 1469.1006$ ($[M+3H]^{3+}_{\text{berechnet}} = 1469.0851$). Im Assay mit AlbA wurde 2b-SboA^{C13A} Spezies mit einem m/z-Verhältnis von $[M+3H]^{3+} = 1429.7405$ ($[M+3H]^{3+}_{\text{berechnet}} = 1429.7270$) detektiert. Eine weitere Modifikation mit Iodacetamid war nicht erfolgreich. Nach Iodacetamidzugabe wurde wieder 2b-SboA^{C13A} mit einem m/z-Verhältnis von $[M+3H]^{3+} = 1429.7477$ beobachtet. Im Assay ohne SAM und der Zugabe von Iodacetamid wurde nicht modifiziertes SboA^{C13A} detektiert.

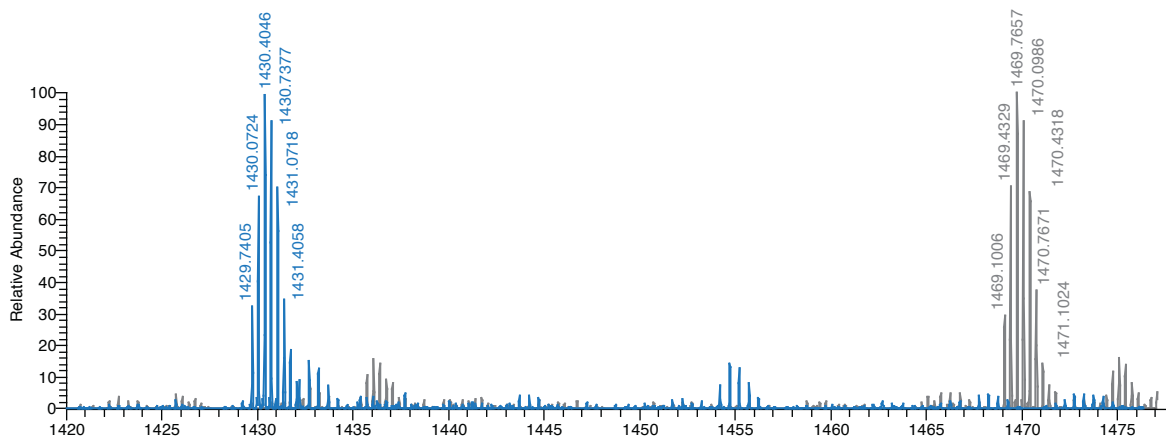


Abbildung 4.17: Massenspektren der HPLC-HRMS-Analyse der Kontrolle (grau) und des Assays (blau) der SboA^{C13A}-Variante nach Iodacetamidzugabe. Im Assay ist eine SboA^{C13A}-Spezies mit einem m/z-Verhältnis von $[M+3H]^{3+} = 1429.7405$ zu identifizieren, wohingegen in der Kontrolle eine SboA^{C13A}-Spezies mit einem m/z-Verhältnis von $[M+3H]^{3+} = 1469.1006$ zu detektieren ist.

Die Ergebnisse der HPLC-HRMS-Analyse der Assays der SboA^{C4A}-Variante sind in Abbildung A.6 gezeigt. Die Variante zeigt dasselbe Verhalten wie die SboA^{C13A}-Mutante. In der Kontrolle ist ebenfalls die nicht modifizierte SboA^{C4A}-Spezies mit einem m/z-Verhältnis von $[M+3H]^{3+} = 1431.0822$ ($[M+3H]^{3+}_{\text{berechnet}} = 1431.0708$) zu beobachten. Die beiden freien Cysteinreste wurden durch Zugabe von Iodacetamid carbamidomethyliert. Es bildete sich eine Verbin-

dung mit einem m/z -Verhältnis von $[M+3H]^{3+} = 1469.0998$ ($[M+3H]^{3+}_{\text{berechnet}} = 1469.0851$). Dieses zweifach carb-amidomethylierte SboA^{C4A}-Derivat ist ebenfalls nach der Zugabe von Iodacetamid im Assay ohne Zugabe von SAM zu identifizieren. Im Assay mit AlbA bildete sich wie bei der SboA^{C13A}-Variante eine zweifach verbrückte SboA^{C4A}-Spezies mit einem m/z -Verhältnis von $[M+3H]^{3+} = 1429.7379$ ($[M+3H]^{3+}_{\text{berechnet}} = 1429.7270$). Diese 2b-SboA^{C4A}-Spezies war durch Zugabe von Iodacetamid nicht weiter zu modifizieren.

Die Ergebnisse der HPLC-HRMS-Analyse der Assays der SboA^{C7A}-Variante sind in Abbildung A.7 zusammengefasst. In der Kontrolle ist wie erwartet die nicht modifizierte SboA^{C7A}-Spezies mit einem m/z -Verhältnis von $[M+3H]^{3+} = 1431.0860$ ($[M+3H]^{3+}_{\text{berechnet}} = 1431.0708$) zu identifizieren. Durch Zugabe von Iodacetamid wurden die beiden freien Cysteinreste carbamidomethyliert ($[M+3H]^{3+}_{\text{berechnet}} = 1469.0851$). Ein interessantes Ergebnis wurde in den Assays mit AlbA beobachtet. Bei einer Retentionszeit von 18.7 min wurde im extrahierten Ionenchromatogramm ein Peak detektiert, dessen zugehöriges Massenspektrum einer Überlagerung der berechneten Massenspektren von einfach ($[M+3H]^{3+}_{\text{berechnet}} = 1430.3989$) und zweifach ($[M+3H]^{3+}_{\text{berechnet}} = 1429.7270$) verbrücktem SboA^{C7A} entspricht. Wird der Assay mit Iodacetamid versetzt, sind im extrahierten Ionenchromatogramm zwei Peaks zu identifizieren (Abbildung 4.18). Bei der Verbindung mit einer Retentionszeit von 17.4 min und einem m/z -Verhältnis von $[M+3H]^{3+} = 1449.4118$ handelt es sich um einfach verbrücktes SboA^{C7A}, das zusätzlich einfach carbamidomethyliert wurde ($[M+3H]^{3+}_{\text{berechnet}} = 1449.4060$). Bei der zweiten Verbindung mit einer Retentionszeit von 19.0 handelt es sich um 2b-SboA^{C7A}. Beide Verbindungen wurden ungefähr im Verhältnis 1:1 gebildet. Wird der Assay ohne SAM durchgeführt, ist nach Zugabe von Iodacetamid zweifach carbamidomethyliertes SboA^{C7A} zu beobachten.

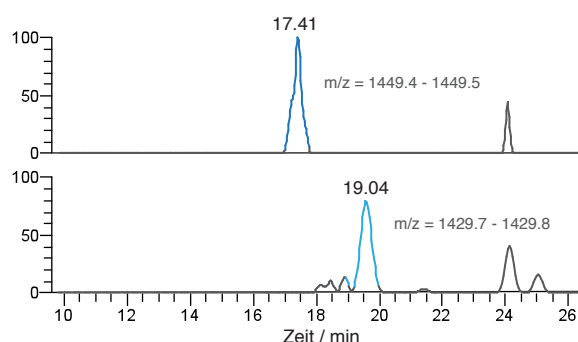


Abbildung 4.18: Extrahierte Ionenchromatogramme der HPLC-HRMS-Analyse des Assays mit AlbA und SboA^{C7A}. Es wurde jeweils das m/z -Verhältnis von dreifach positiv geladenem 2b-SboA und 1b-SboA, das zusätzlich über eine Carbamidomethylierung verfügt, extrahiert.

4.1.12 Modifikationsassays mit der leaderpeptidlosen SboA-Variante

Um den Einfluss des Leaderpeptids auf die von AlbA katalysierte Thioetherbrückenbildung zu untersuchen, wurden Vorläuferpeptidmodifikationsassays mit einer leaderpeptidlosen SboA-Variante (IISboA), in der die ersten acht N-terminalen Aminosäuren entfernt wurden, durchgeführt. Es wurden, wie unter Kapitel 4.1.8 beschrieben, fünf verschiedene Assays realisiert. Die Ergebnisse der anschließenden HPLC-HRMS-Analysen sind in den Abbildung 4.19 und A.10 gezeigt.

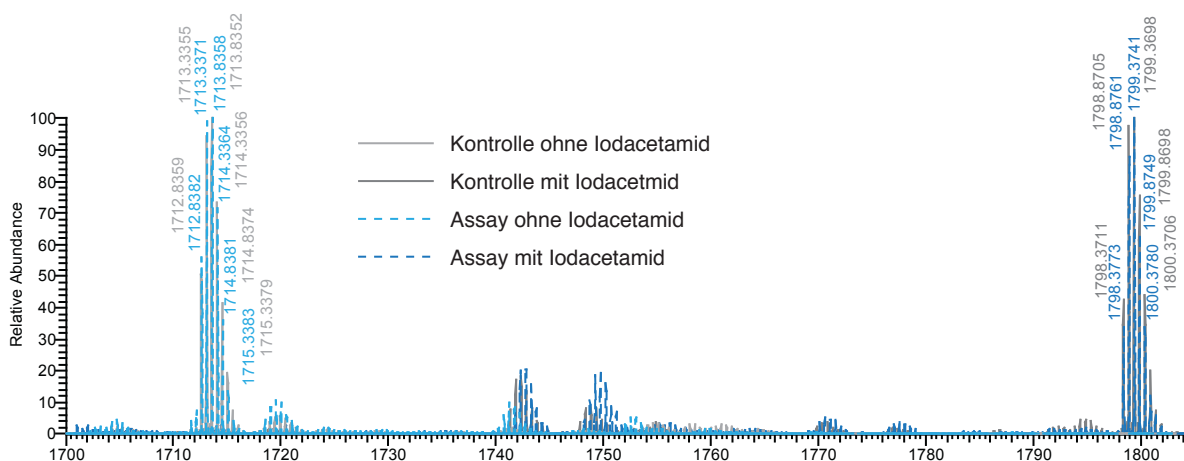


Abbildung 4.19: Massenspektren der HPLC-HRMS-Analysen der verschiedenen Vorläuferpeptidmodifikationsassays mit IISboA. Gezeigt sind jeweils die Massenspektren der in Abbildung A.10 extrahierten Peaks.

In der Kontrolle wurde das nicht modifizierte IISboA-Peptid mit einer Retentionszeit von 19.0 min und einem m/z -Verhältnis von $[M+2H]^{2+} = 1712.8359$ ($[M+2H]^{2+}_{\text{berechnet}} = 1712.8228$) nachgewiesen. Wurde das nicht modifizierte IISboA mit Iodacetamid versetzt, ist die Bildung der dreifach carbamidomethylierten Spezies mit einer Retentionszeit von 18.0 min und einem m/z -Verhältnis von $[M+2H]^{2+} = 1798.3711$ ($[M+2H]^{2+}_{\text{berechnet}} = 1798.3550$) zu beobachten. Im Assay mit AlbA, aber ohne Iodacetamid, wurde ebenfalls nicht modifiziertes IISboA mit einer Retentionszeit von 18.9 min und einem m/z -Verhältnis von $[M+2H]^{2+} = 1712.8382$ nachgewiesen. Wurde diese Verbindung mit Iodacetamid versetzt, wurde sie ebenfalls dreimal carbamidomethyliert ($t_R = 17.9$ min; $[M+2H]^{2+} = 1798.3773$). AlbA ist demnach nicht in der Lage, die Thioetherbindungen in das leaderpeptidlose Vorläuferpeptid einzuführen. Im Assay ohne SAM, aber mit der Zugabe von Iodacetamid, wurde ebenfalls nicht modifiziertes aber dreifach carbamidomethyliertes IISboA beobachtet.

4.1.13 Zeitabhängigkeit der Thioetherbrückenbildung in SboA

Um erste Einblicke in die Zeitabhängigkeit der Thioetherbrückenbildung zu erhalten, wurde SboA mit AlbA inkubiert. Nach definierten Zeitabschnitten wurden die Assays mit Iodacetamid versetzt, um nicht modifizierte Cysteinreste am SboA zu carbamidomethylieren. Die Reaktion wurde somit nach dem definierten Zeitabschnitt „eingefroren“ und anschließend per HPLC-HRMS analysiert. Zwischen den unterschiedlich häufig verknüpften SboA-Spezies konnte dabei leicht unterschieden werden, da sie durch die verschiedene Anzahl an Carbamidomethylierungen eine minimale Massendifferenz von 57.0215 u aufwiesen. Auf die prozentuale Zusammensetzung der Reaktionslösung konnte durch die Integrale der extrahierten Ionenchromatogramme geschlossen werden. Dazu wurden zunächst die m/z-Verhältnisse der folgenden dreifach positiv geladenen SboA-Spezies extrahiert: SboA-3IA; 1b-SboA-2IA; 2b-SboA-1IA; 3b-SboA². Im Anschluss wurden die Flächen unter den extrahierten Peaks und die Gesamtfläche bestimmt. Die Gesamtfläche entspricht der Gesamtmenge an detektierten SboA-Spezies. Der prozentuale Anteil einer speziellen SboA-Spezies ergibt sich aus dem Verhältnis der Peakfläche der Spezies zu der Gesamtfläche. Für jeden Zeitpunkt wurden drei Assays durchgeführt. Für die Methode wurde angenommen, dass alle untersuchten SboA-Spezies über das gleiche Ionisationsvermögen verfügen. Die Zeitabhängigkeit der Thioetherbrückenbildung ist in Abbildung 4.20 graphisch dargestellt.

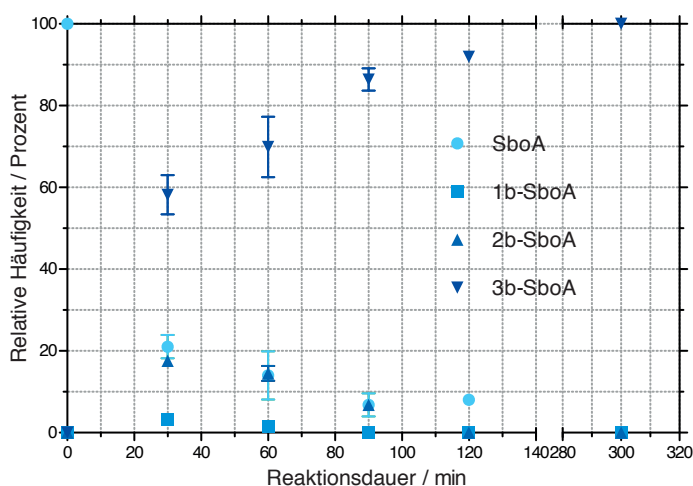


Abbildung 4.20: Zeitabhängigkeit der von AlbA katalysierten Thioetherbrückenbildung in SboA. Die unterschiedlich häufig verknüpften SboA-Spezies wurden nach der Carbamidomethylierung freier Cysteinreste per HPLC-HRMS identifiziert. Das dreifach verbrückte SboA-Derivat wird über das einfach und zweifach verbrückte Derivat gebildet. Nach 120 min wurden ca. 90% des Vorläuferpeptids in das Endprodukt 3b-SboA konvertiert.

² siehe Abkürzungsverzeichnis

Nach 30 min waren ca. 60% des eingesetzten Vorläuferpeptids in die dreifach verbrückte Form überführt. Zeitgleich lagen ca. 16% 2b-SboA, ca. 4% 1b-SboA und ca. 20% SboA vor. Nach 60 min waren ca. 70% des eingesetzten SboA in das Endprodukt konvertiert. Es ließen sich nur noch sehr geringe Mengen an 1b-SboA identifizieren. Von 2b-SboA und SboA konnten jeweils ca. 15% nachgewiesen werden. Nach 90 min nahm die Menge an 2b-SboA und SboA auf unter 10% ab. 1b-SboA war nicht mehr nachzuweisen. Die Menge an 3b-SboA hatte sich auf ca. 85% erhöht. Eine vollständige Umsetzung in das dreifach verbrückte SboA-Derivat ließ sich nach fünfstündiger Inkubation mit AlbA nachweisen.

4.1.14 Identifikation der zweiten [4Fe-4S]-Clusterbindungsstelle in AlbA

Durch die Charakterisierung der AlbA^{C129A C133A C136A}-Mutante wurde gezeigt, dass AlbA zwei [4Fe-4S]-Cluster bindet. Um die zweite [4Fe-4S]-Clusterbindungsstelle identifizieren zu können, wurde ein Alignment mit insgesamt fünf Radical SAM Enzymen, die voraussichtlich an der Biosynthese von Sactipeptiden beteiligt sind, angefertigt (Abbildungen 4.21 und A.11).

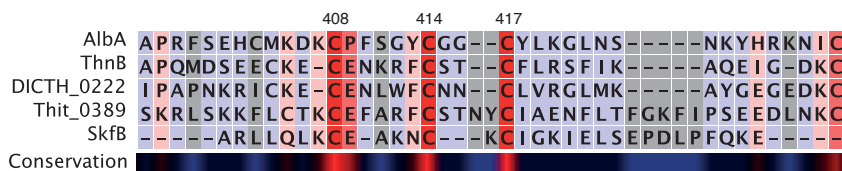


Abbildung 4.21: Aminosäuresequenzalignment der C-terminalen Region von fünf Radical SAM Enzymen, die voraussichtlich an der Biosynthese von Sactipeptiden beteiligt sind. ThnB ist in der Biosynthese von Thurincin H, SkfB ist in der Biosynthese des Sporulation Killing Factors involviert. Bei DICTH_0222 handelt es sich um ein putatives Radical SAM Enzym aus *Dictyoglomus thermophilum* H-6-12, bei Thit_0389 um ein putatives Radical SAM Enzym aus *Thermoanaerobacter italicus* Ab9. Beide putativen Radical SAM Enzyme kommen in Genclustern vor, die über die gleiche Organisation wie das *skf*- oder *sbo/alb*-Operon verfügen (Kapitel 4.3). In der hier untersuchten C-terminalen Aminosäuresequenzregion sind drei Cysteinreste konserviert.

Das Aminosäuresequenzalignment wurde auf zusätzliche zum CXXXCXXC-Motiv konservierte Cysteinreste analysiert. In der C-terminalen Region der Proteine wurden drei weitere Cysteinreste gefunden, die in allen untersuchten Radical SAM Enzymen vorkamen. Um zu überprüfen, ob diese Cysteine an der Koordination des zweiten in AlbA gebundenen [4Fe-4S]-Clusters beteiligt sind, wurde die AlbA^{C408A C414A C417A}-Mutante per SLIM-Mutagenese generiert. Die anschließende Expression und Reinigung wurde gemäß der anderen AlbA-Spezies durchgeführt. Die AlbA^{C408A C414A C417A}-Mutante wurde in gleicher Reinheit wie die AlbA-Varianten des CXXXCXXC-Motivs und mit einer Ausbeute von ca. 11 mg pro Liter Expressionskultur gewonnen. Die Bestimmung des in der Mutante enthaltenen Eisengehalts erfolgte analog zu der AlbA^{C129A}- und der AlbA^{C129A C133A C136A}-Variante. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.3 zusammenge-

fasst. Es ergab sich ein durchschnittlicher Eisengehalt von 5.24 ± 0.25 Äquivalenten. Die Eisenmenge hat im Vergleich zu AlbA um ca. 3 Äquivalente im gleichen Umfang abgenommen wie die Eisenmenge der AlbA Triple Alanin-Mutante innerhalb des CXXXCXXC-Motivs im Vergleich zu AlbA. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass der zweite [4Fe-4S]-Cluster von den drei Cysteinen Cys408, Cys414 und Cys417 koordiniert wird.

Tabelle 4.3: Bestimmung des Eisengehalts der AlbA^{C408A C414A C417A} Triple Alanin-Mutante.

n (AlbA ^{C408A C414A C417A})	OD ₅₉₃	n (Fe ³⁺)	Verhältnis AlbA ^{C408A C414A C417A} :Fe ³⁺
0.90 nmol	0.146	4.37 nmol	1 : 4.86
1.35 nmol	0.225	6.73 nmol	1 : 4.99
1.80 nmol	0.317	9.48 nmol	1 : 5.27
1.80 nmol	0.336	10.0 nmol	1 : 5.56
2.26 nmol	0.419	12.5 nmol	1 : 5.53

Des Weiteren wurde die AlbA^{C408A C414A C417A}-Mutante mittels UV-Vis- und EPR-Spektroskopie charakterisiert (Abbildung 4.22), um den Bindungszustand der koordinierten Eisen-Ionen zu bestimmen. Das UV-Vis-Spektrum (Abbildung 4.22a) der nicht reduzierten AlbA-Mutante zeigt Absorptionsbanden bei 320 nm und 430 nm, was auf die Anwesenheit mindestens eines [4Fe-4S]-Clusters deutet (Ugulava et al., 2000). Ebenfalls ist eine Absorptionsbande bei 620 nm zu identifizieren, was auf unspezifisch gebundenes Eisen hindeutet. Dieses unspezifisch gebundene Eisen könnte den Unterschied in der gemessenen Eisenmenge von 5.24 ± 0.25 Äquivalenten und der zu erwarteten Eisenmenge von 4 Äquivalenten für ein Protein, das einen [4Fe-4S]-Cluster enthält erklären.

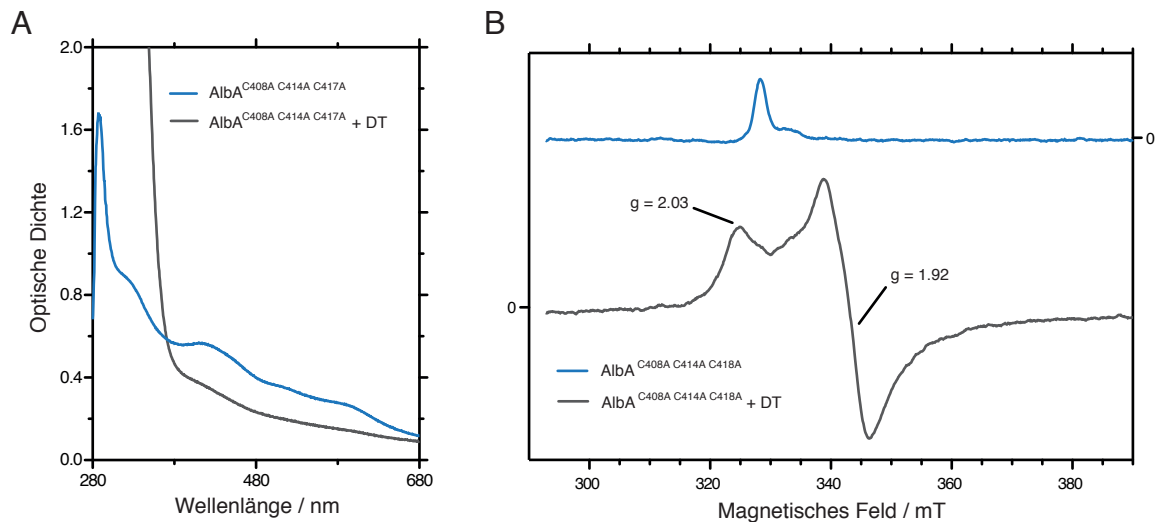


Abbildung 4.22: Charakterisierung der AlbA^{C408A C414A C417A}-Mutante mittels UV-Vis- und EPR-Spektroskopie. (A) Das UV-Vis-Spektrum der nicht reduzierten AlbA-Variante (blau) zeigt die für Fe/S-Cluster charakteristische Absorptionsbanden bei 320 nm und 430 nm. Darüber hinaus ist eine Absorptionsbande bei 620 nm zu identifizieren. Das reduzierte Protein (grau) zeigt keine spezifischen Absorptionsbanden. (B) Das EPR-Spektrum der nicht reduzierten AlbA-Variante zeigt ein EPR-Signal bei $g = 2.01$. Im Gegensatz dazu verfügt die mit Natriumdithionit reduzierte AlbA-Mutante über EPR-Signale bei $g = 2.03$ und $g = 1.92$.

Die reduzierte AlbA-Variante besitzt, wie erwartet, keine charakteristischen Absorptionsbanden. Das EPR-Spektrum von reduziertem AlbA^{C408A C414A C417A} zeigt hingegen charakteristische EPR-Signale bei $g = 2.03$ und $g = 1.92$ (Abbildung 4.22b), was auf die Anwesenheit eines $[4\text{Fe-4S}]^+$ -Clusters schließen lässt. Das Spektrum der nicht reduzierten AlbA-Mutante zeigt wie das Spektrum der nicht reduzierten AlbA^{C129A C133A C136A}-Variante ein EPR-Signal bei $g = 2.01$. Diesem Signal ist ein $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster zuzuordnen, der sich aus dem, durch das CXXXCXXC-Motiv gebundenen, $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster durch den Verlust des nicht koordinierten Eisen-Ions bildet (Duschene and Broderick, 2010).

Aus den Ergebnissen der UV-Vis- und EPR-spektroskopischen Charakterisierung der AlbA-Variante ist davon auszugehen, dass der durch das CXXXCXXC-Motiv gebundene $[4\text{Fe-4S}]$ -Cluster intakt ist. Um diese Vermutung weiter zu untersuchen, wurde die SAM-Spaltungsaktivität der AlbA^{C408A C414A C417A}-Mutante bestimmt (Abbildung 4.23).

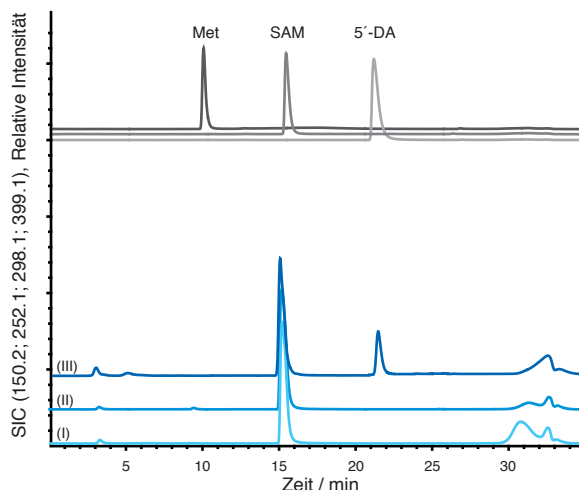


Abbildung 4.23: *Single-Ion* Chromatogramme (SICs) der SAM-Spaltungsaktivitätsassays mit AlbA^{C408A C414A C417A}. Die grauen Chromatogramme entsprechen Standards von Methionin (Met), SAM und 5'-dA. Die blauen Chromatogramme zeigen die HPLC-MS-Analysen der verschiedenen Assayzusammensetzungen. (I) entspricht der Kontrolle ohne AlbA-Variante mit SAM und DT, (II) entspricht der Kontrolle mit AlbA-Variante und SAM aber ohne DT und (III) entspricht dem Assay mit SAM, AlbA-Variante und DT.

Die Kontrollreaktionen und der Assay wurden jeweils vier Stunden inkubiert. In den beiden Kontrollen wurde die Spaltung von SAM in Met und 5'-dA, wie erwartet, nicht beobachtet. Im Assay konnten beide Produkte der reduktiven Spaltung nachgewiesen werden. Dabei wurden aus den vorhandenen 15 Äquivalenten SAM 0.7 Äquivalente 5'-dA gebildet. Das sind 7.3 Äquivalente weniger als beim Assay mit dem AlbA-Wildtyp beobachtet wurden. Die AlbA^{C408A C414A C417A}-Variante ist demnach nur noch in der Lage, eine einzige reduktive-SAM-Spaltung pro Äquivalent Enzym zu katalysieren.

Um Rückschlüsse auf die Funktion des zweiten [4Fe-4S]-Cluster ziehen zu können, wurden Vorläuferpeptidmodifikationsassays mit SboA und der AlbA^{C408A C414A C417A}-Mutante durchgeführt. Es wurden jeweils eine Kontrolle, ein vollständiger Assay (Abbildung 4.24) und ein Assay mit der Zugabe von Iodacetamid (Abbildung A.12) durchgeführt. Im extrahierten Ionenchromatogramm des Assays (Abbildung 4.24a) wurde ein Peak mit einer Retentionszeit von 17.8 min detektiert. Der zugehörigen Verbindung ist ein m/z -Verhältnis von $[M+3H]^{3+} = 1441.7316$ zuzuordnen. Das Massenspektrum (Abbildung 4.24b, blau) ist identisch mit dem des nicht modifizierten SboA aus der Kontrolle (grau). Wird der Assay mit Iodacetamid versetzt, ist eine Verbindung mit einem m/z -Verhältnis von $[M+3H]^{3+} = 1498.7525$ zu detektieren. Dieses m/z -Verhältnis entspricht dem von dreifach carbamidomethylierten SboA. Die AlbA^{C408A C414A C417A}-Mutante ist demnach nicht mehr in der Lage, die Thioetherbrückenbildung in SboA zu katalysieren.

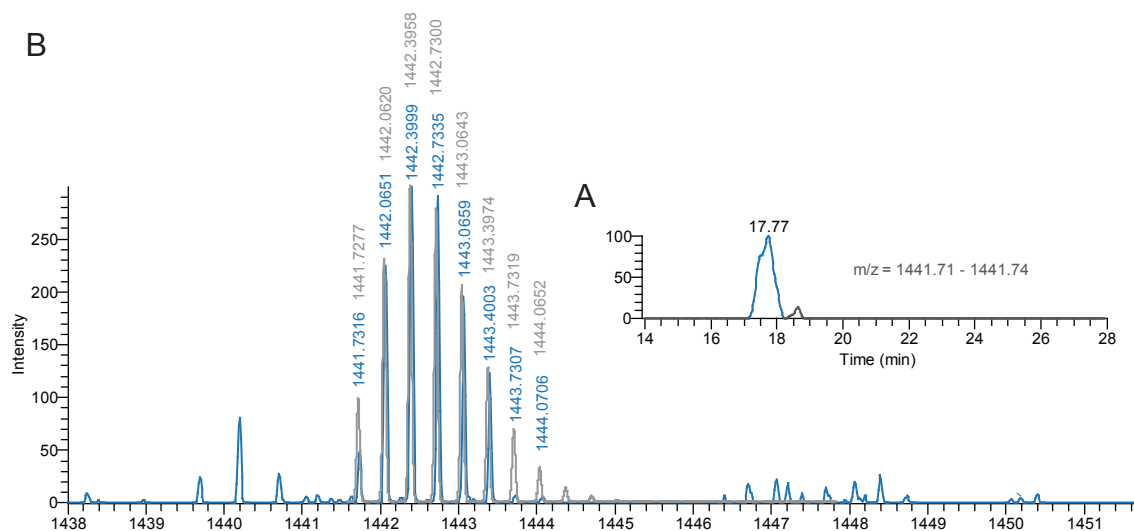


Abbildung 4.24: HPLC-HRMS-Analyse des Assays und der Kontrolle mit SboA und der AlbA^{C408A C414A C417A}-Mutante. (A) Extrahiertes Ionenchromatogramm des vollständigen Assays. Die extrahierte Masse ist mit angegeben. Es wurde ein Peak mit einer Retentionszeit von 17.8 min extrahiert. (B) Massenspektrum der Kontrolle (grau) und des in (A) extrahierten Peaks (blau). Da die Massenspektren fast identisch sind, kann davon ausgegangen werden, dass es sich jeweils um die gleiche Verbindung handelt.

4.1.15 Interaktionsstudien mit SboA, IISboA, AlbA und AlbA-Varianten

Auf Grund der Tatsache, dass die AlbA^{C408 C414A C417A}-Mutante nicht mehr in der Lage ist, die Thioetherbrückenbildung in SboA zu katalysieren, wurde gezeigt, dass der zweite in AlbA gebundene [4Fe-4S]-Cluster eine wichtige Rolle in der Synthese der Thioether spielt. Um die Funktion dieses Fe/S-Clusters weiter zu untersuchen, wurden UV-Vis-Interaktionsstudien mit SboA, IISboA, AlbA, AlbA^{C129A C133A C136A} und AlbA^{C408A C414A C417A} durchgeführt. Für jede untersuchte AlbA-Variante wurden jeweils drei verschiedene UV-Vis-Spektren aufgenommen: 1.) das normale Spektrum ohne Zugabe weiterer Verbindungen, 2.) das Spektrum mit Zugabe von SboA im Verhältnis 1:4 und 3.) das Spektrum mit Zugabe von IISboA im Verhältnis 1:4 (Abbildung 4.25).

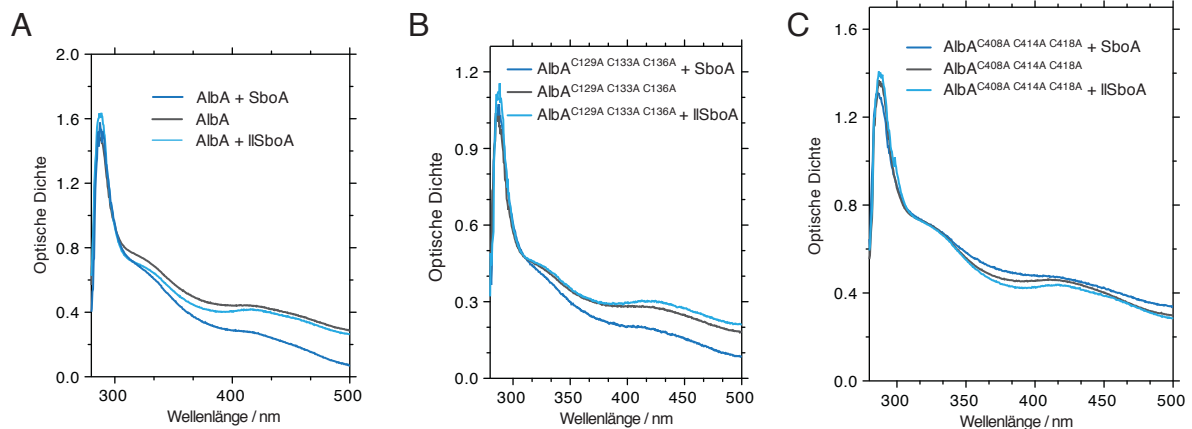


Abbildung 4.25: UV-Vis-Interaktionsstudien mit SboA, IISboA, AlbA und AlbA-Mutanten. (A) UV-Vis-Spektren von AlbA. (B) UV-Vis-Spektren von AlbA^{C129A C133A C136A}. (C) UV-Vis-Spektren von AlbA^{C408A C414A C418A}.

Die UV-Vis-Spektren von AlbA, AlbA^{C129A C133A C136A} und AlbA^{C408A C414A C418A} sind weitestgehend identisch mit den schon gemessenen Spektren der rekonstituierten Proteine. Alle UV-Vis-Spektren besitzen die für [4Fe-4S]-Cluster charakteristischen Absorptionsbanden bei 325 nm und 410 nm. Wurde die jeweilige AlbA-Spezies mit dem leaderpeptidlosen Vorläuferpeptid versetzt änderte sich das jeweilige Absorptionsspektrum nur minimal, was darauf hindeutet, dass keine Interaktion zwischen den [4Fe-4S]-Clustern und IISboA stattfindet. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit dem Ergebnis, dass AlbA nicht in der Lage ist, die Generierung der Thioether in IISboA zu katalysieren. Wurde AlbA mit dem vollständigen Vorläuferpeptid SboA versetzt, konnte eine geringe Abnahme der Absorption bei einer Wellenlänge um 325 nm und eine deutliche Abnahme der Absorption bei einer Wellenlänge um 410 nm festgestellt werden. Dieses Verhalten deutet auf eine Interaktion zwischen SboA und einem in AlbA gebundenen [4Fe-4S]-Cluster hin. Um den Cluster genauer zu bestimmen wurden die beiden AlbA-Mutanten mit SboA versetzt. Bei der AlbA^{C129A C133A C136A}-Mutante, in der der zweite [4Fe-4S]-Cluster gebunden ist, wurde ebenfalls eine Abnahme der Absorption bei 325 nm und 410 nm beobachtet. Bei der AlbA^{C408 C414A C417A}-Mutante, in der der erste [4Fe-4S]-Cluster gebunden ist, wurde keine Abnahme der Absorption beobachtet. Das aufgenommene Spektrum war größtenteils identisch zu dem der AlbA-Variante. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass SboA mit dem zweiten in AlbA gebundenen [4Fe-4S]-Cluster interagiert, da die Absorptionsabnahme nur bei AlbA und der AlbA^{C129A C133A C136A}-Mutante aufgetreten ist.

4.1.16 *In vivo*-System zur Analyse der Produktion von Subtilisin A-Varianten

Zur weiteren Untersuchung der von AlbA katalysierten Reaktion wurde auf ein von Michael Gattner etabliertes *in vivo*-System (Gattner, 2010) zurückgegriffen, mit dem es möglich ist, die Produktion von Subtilisin A-Varianten in *B. subtilis* 168 zu untersuchen. Für das System wurde

zunächst *sboA* in den pDG148-Vektor kloniert. Bei diesem Plasmid handelt es sich um einen *B. subtilis*-Expressionsvektor, der in *E. coli* amplifiziert werden kann. Die Generierung von *sboA*-Varianten wurde mittels Mutagenese durchgeführt. Anschließend wurden *B. subtilis* 168-Zellen mit dem korrekten pDG148 *sboA*^{Variante}-Plasmid transformiert (Abbildung 4.26a).

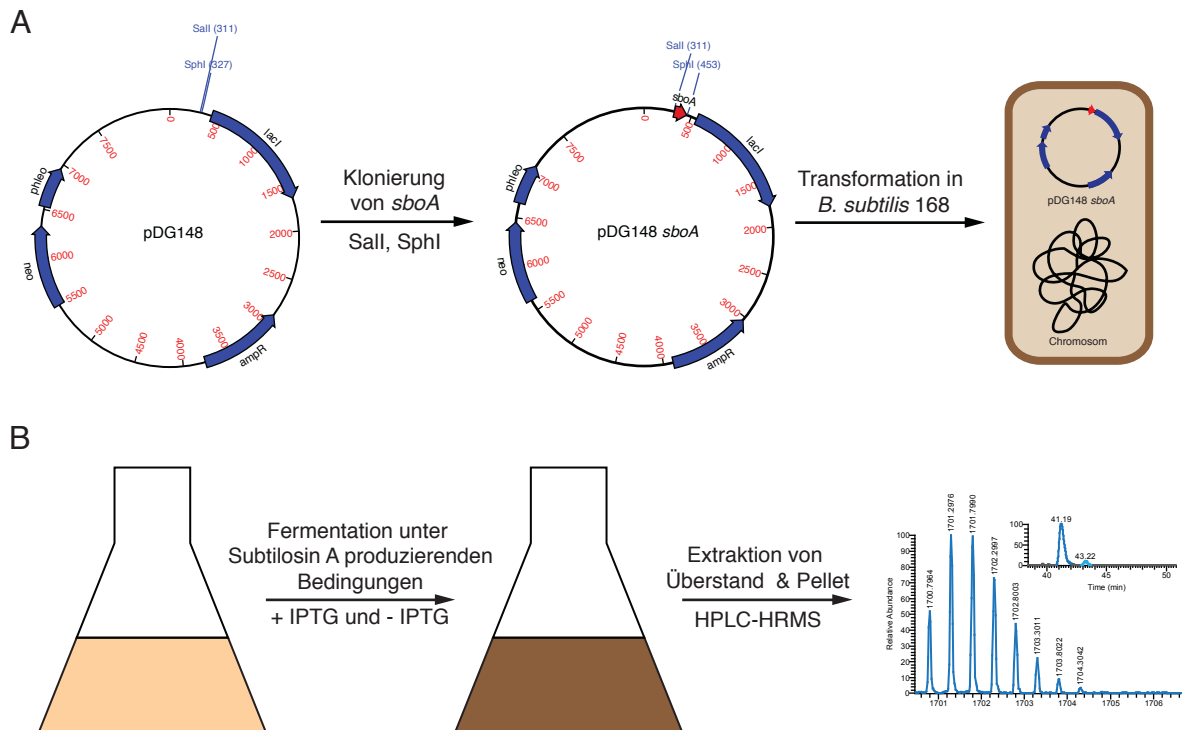


Abbildung 4.26: *In vivo*-System zur Analyse der Produktion von Subtilosin A-Varianten. (A) In den pDG148-Vektor wurde *sboA* kloniert und mittels Mutagenese variiert. Anschließend wurden *B. subtilis* 168-Zellen mit dem generierten pDG148 *sboA*^{Variante}-Plasmid transformiert. (B) Die so hergestellte *B. subtilis*-Kultur wurde unter Subtilosin A-produzierenden Bedingungen fermentiert. Die Expression der SboA-Variante wurde mit IPTG induziert. Nach ausreichender Fermentationszeit wurden das Zellpellet und der Überstand extrahiert und mittels HPLC-HRMS auf die Produktion von Subtilosin A und der Subtilosin A-Variante analysiert.

Die Zellen wurden mittels Antibiotikaresistenz selektiert und unter Subtilosin A-produzierenden Bedingungen fermentiert. Durch Zugabe von IPTG konnte die Expression der SboA-Variante induziert werden. Da ebenfalls alle Gene des *sbo/alb*-Operons unter den Fermentationsbedingungen expremiert wurden, wurde die SboA-Variante, falls möglich, durch die prozessierenden Enzyme des Operons postranslational zur respektiven Subtilosin A-Variante modifiziert. Der Überstand und das Zellpellet wurden anschließend extrahiert und per HPLC-HRMS analysiert (Abbildung 4.26b). Dabei wurde das jeweilige Extrakt zunächst auf die Anwesenheit von Subtilosin A kontrolliert. Durch diese interne Kontrolle wurde gewährleistet, dass die Gene des *sbo/alb*-Operons unter den Fermentierungsbedingungen tatsächlich expremiert wurden und aktiv waren. Danach wurde das jeweilige Extrakt auf die jeweilige Subtilosin A-Variante unter-

sucht. Für jede Subtilisin A-Variante wurden vier Extrakte hergestellt: 1.) die Extrakte des Überstandes und des Zellpellets einer Kultur, die mit IPTG versetzt war und 2.) die Extrakte des Überstandes und des Zellpellets einer Kultur, die nicht mit IPTG versetzt war. So konnte sichergestellt werden, dass es sich in einer mit IPTG versetzten Kultur tatsächlich um eine Subtilisin A-Variante handelt, wenn diese nicht in der Kultur, die nicht mit IPTG versetzt war, detektiert werden konnte.

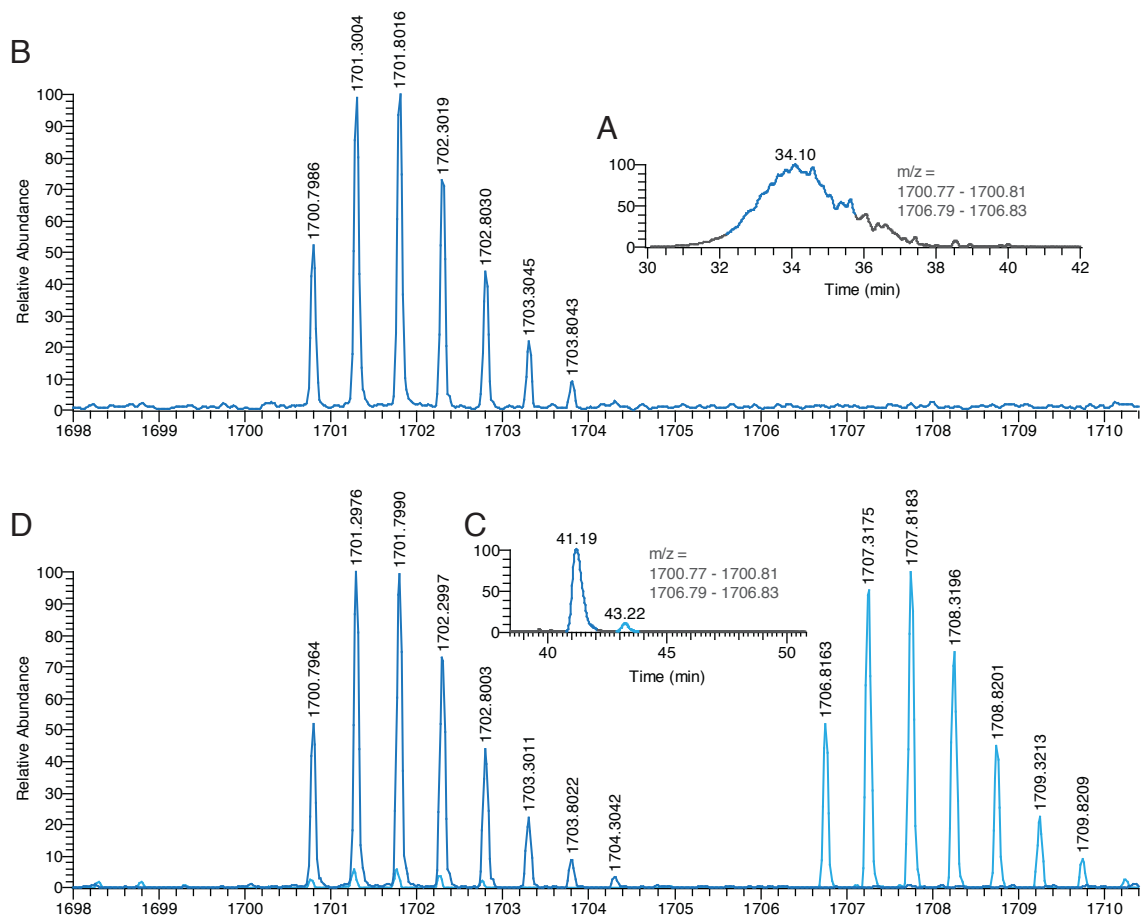


Abbildung 4.27: HPLC-HRMS-Analyse der Zellpelletextrakte der *B. subtilis* 168 pDG148 *sboA*^{T6I}-Kulturen. (A) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Zellpelletextraktes der Kultur, die nicht mit IPTG versetzt wurde. Es wurden jeweils die *m/z*-Verhältnisse von zweifach positiv geladenem Subtilisin A und Subtilisin A^{T6I} extrahiert. (B) Massenspektrum der Verbindung des in (A) extrahierten Peaks. Sie besitzt ein *m/z*-Verhältnis von $[M+2H]^{2+} = 1700.7986$ und entspricht demnach Subtilisin A. (C) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Zellpelletextraktes der Kultur, die mit IPTG versetzt wurde. Es wurden jeweils die *m/z*-Verhältnisse von zweifach positiv geladenem Subtilisin A und Subtilisin A^{T6I} extrahiert. Im Vergleich zu (A) ist ein weiterer Peak zu beobachten. (D) Massenspektren der Verbindungen der in (C) extrahierten Peaks. Zusätzlich zu Subtilisin A ist die Subtilisin A^{T6I}-Variante mit einem *m/z*-Verhältnis von $[M+2H]^{2+} = 1706.8163$ zu detektieren.

Um die Funktionsfähigkeit des *in vivo*-Systems zu überprüfen, wurde zunächst die homologe Expression der zuvor charakterisierten Subtilisin A^{T6I}-Variante (Huang et al., 2009) untersucht. Die HPLC-HRMS-Analyse der Zellpelletextrakte ist in Abbildung 4.27, die der Überstandsextrak-

te in Abbildung A.13 gezeigt. Im Extrakt des Zellpellets der *B. subtilis*-Kultur ohne IPTG-Zugabe (Abbildung 4.27a&b) lässt sich, wie erwartet, keine Verbindung mit dem berechneten m/z-Verhältnis von Subtilosin A^{T6I} von $[M+2H]^{2+} = 1706.8122$ detektieren. Die Bestätigung, dass die Kultur unter Subtilosin A-produzierenden Bedingungen fermentiert wurde, gelang durch die Identifizierung einer Verbindung mit einem m/z-Verhältnis von $[M+2H]^{2+} = 1700.7986$, die dem von Subtilosin A von $[M+2H]^{2+} = 1700.7940$ entspricht. Im Zellpelletextrakt der mit IPTG versetzten Kultur (Abbildung 4.27c&d) ist zusätzlich zu Subtilosin A die Subtilosin A^{T6I}-Variante mit einem m/z-Verhältnis von $[M+2H]^{2+} = 1706.8163$ zu beobachten. In den Extrakten des Zellüberstands der beiden *B. subtilis*-Kulturen ist jeweils nur Subtilosin A zu detektieren (Abbildung A.13). Die Ergebnisse bestätigen die Funktionsfähigkeit des *in vivo*-Systems zur Analyse der Produktion von Subtilosin A-Varianten. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass in Zellpellet und Überstand nach der jeweiligen Subtilosin A-Variante gesucht werden muss, da die Subtilosin A^{T6I}-Variante nur im Zellpellet detektiert wurde.

Zur Charakterisierung der während der Biosynthese von Subtilosin A vorkommenden Reifungsschritte wurden zehn SboA-Varianten getestet, ob sie *in vivo* durch AlbA, AlbE und AlbF in die entsprechenden Subtilosin A-Varianten prozessiert werden können. Zunächst wurden die drei SboA-Varianten SboA^{C4A}, SboA^{C7A} und SboA^{C13A}, in denen jeweils ein Cystein durch Alanin ersetzt wurde, untersucht. Weil es durch die Mutation eines Cysteins zu Alanin nur zur Ausbildung von zwei Thioetherbrücken kommen kann, wurde in den Extrakten nach den jeweils zweifach verbrückten Subtilosin A-Spezies gesucht. Das Ergebnis der HPLC-HRMS-Analyse für die SboA^{C7A}-Mutante ist in den Abbildungen 4.28 und A.14 gezeigt. Wie zu erwarten, ist im Zellpellet und im Überstand der *B. subtilis* 168 pDG148 *sboA*^{C7A}-Kultur, die nicht mit IPTG versetzt wurde, nur Subtilosin A nachzuweisen. In der mit IPTG versetzten Kultur ist ebenfalls nur Subtilosin A in Pellet und Überstand nachzuweisen. Die Ergebnisse der SboA^{C4A} und SboA^{C13A} sind dementsprechend gleich (Tabelle 4.4). In keiner der untersuchten *B. subtilis*-Kulturen konnten zweifach verbrückte Subtilosin A^{C7A}-Mutanten detektiert werden.

Im zweiten Schritt wurde die Reifung der vier SboA-Varianten SboA^{F22A}, SboA^{T28A}, SboA^{F31A} und SboA^{F31Y} untersucht. Mit den Mutationen innerhalb der Akzeptor-Position sollten Rückschlüsse auf die Toleranz und Regiospezifität von AlbA getroffen werden. Die Extrakte wurden jeweils auf die Produktion der zweifach und dreifach verbrückten Subtilosin A-Varianten untersucht. In den mit IPTG versetzten *B. subtilis*-Kulturen der SboA-Varianten SboA^{F22A}, SboA^{T28A} und SboA^{F31A} konnte weder im Pellet noch im Zellüberstand die jeweilige Subtilosin A-Variante detektiert werden (Tabelle 4.4). In allen Extrakten war jedoch Subtilosin A nachzuweisen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Kulturen unter den richtigen Bedingungen fermentiert

wurden. In den Extrakten der mit IPTG versetzten *B. subtilis* 168 pDG148 *sboA*^{F31Y}-Kultur wurde die dreifach verbrückte Subtilosin A^{F31Y}-Variante identifiziert (Abbildung A.15) (Gattner, 2010).

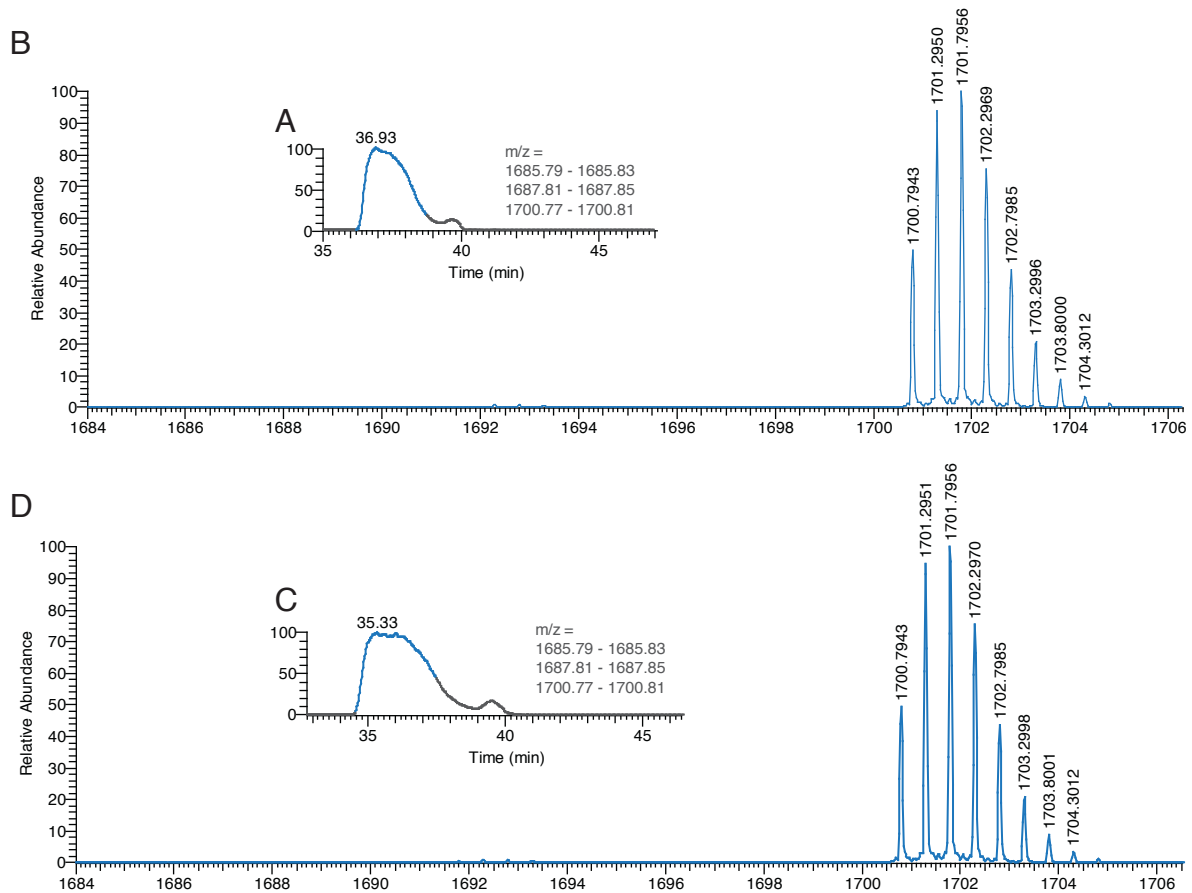


Abbildung 4.28: HPLC-HRMS-Analyse der Zellpelletextrakte der *B. subtilis* 168 pDG148 *sboA*^{C7A}-Kulturen. (A) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Zellpelletextraktes der Kultur, die nicht mit IPTG versetzt wurde. Es wurden jeweils die m/z-Verhältnisse von zweifach positiv geladenen Subtilosin A und Subtilosin A^{C7A} extrahiert. (B) Massenspektrum der Verbindung des in (A) extrahierten Peaks. Sie besitzt ein m/z-Verhältnis von $[M+2H]^{2+} = 1700.7943$ und entspricht demnach Subtilosin A. (C) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Zellpelletextraktes der Kultur, die mit IPTG versetzt wurde. Es wurden jeweils die m/z-Verhältnisse von zweifach positiv geladenen Subtilosin A und Subtilosin A^{C7A} extrahiert. (D) Massenspektrum der Verbindung des in (C) extrahierten Peaks. Es ist erneut nur Subtilosin A zu identifizieren.

Um zu überprüfen, ob AlbA in der Lage ist, die Synthese von Etherbindungen zu katalysieren, wurden die Reifungen der drei SboA-Varianten SboA^{C4S}, SboA^{C7S} und SboA^{C13S} in die jeweilige Subtilosin A-Spezies untersucht. In den jeweiligen Kulturextrakten konnten weder die zweifach noch die dreifach verbrückten Subtilosin A^{C7S}-Varianten identifiziert werden (Tabelle 4.4). Die richtigen Fermentationsbedingungen wurden dadurch bestätigt, dass Subtilosin A jeweils in Pellet und Überstand der unterschiedlichen Kulturen detektiert werden konnte.

Tabelle 4.4: Übersicht über die Ergebnisse des *in vivo*-Systems zur Analyse der Produktion von Subtilosin A-Varianten. Falls nicht genauer angegeben, wurde die entsprechende Subtilosin A-Spezies in Zellpellet und Überstand identifiziert (ja) bzw. nicht identifiziert (nein).

	2b-Subtilosin A-Variante		Subtilosin A-Variante		Subtilosin A	
	+ IPTG	- IPTG	+ IPTG	- IPTG	+ IPTG	- IPTG
SboA ^{T6I}	nein	nein	ja, im Pellet	nein	ja	ja
SboA ^{C4A}	nein	nein	nein	nein	ja	ja
SboA ^{C7A}	nein	nein	nein	nein	ja	ja
SboA ^{C13A}	nein	nein	nein	nein	ja	ja
SboA ^{F22A}	nein	nein	nein	nein	ja	ja
SboA ^{T28A}	nein	nein	nein	nein	ja	ja
SboA ^{F31A}	nein	nein	nein	nein	ja	ja
SboA ^{F31Y}	nein	nein	ja	nein	ja	ja
SboA ^{C4S}	nein	nein	nein	nein	ja	ja
SboA ^{C7S}	nein	nein	nein	nein	ja	ja
SboA ^{C13S}	nein	nein	nein	nein	ja	ja

4.2 Studien zur Biosynthese des Sporulation Killing Factors

4.2.1 Klonierung, Expression und Reinigung von SkfB

Das Gen des Radical SAM Enzyms SkfB wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Leif Flühe (Flühe, 2010) mit den Restriktionsenzymen BamHI und XhoI in den pET-28a(+)-Vektor kloniert (Abbildung 4.29a). Die Expression erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen. Das Reinigungsprotokoll wurde der Diplomarbeit von Leif Flühe (Flühe, 2010) entnommen. Der Hauptreinigungsschritt bestand aus einer Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie, die mit einem sehr flachen Imidazolgradienten durchgeführt wurde. Die Ausbeute an nicht rekonstituiertem SkfB (Abbildung 4.29b) lag bei der Reinigung unter aeroben Bedingungen bei ca. 30 mg pro Liter Kulturmedium. Für die Kristallisation wurde SkfB vollständig unter anaeroben Bedingungen gereinigt, um eine Oligomerisierung während der Rekonstitution zu verhindern. Die dabei erzielte Ausbeute war deutlich höher und lag bei ca. 65 mg pro Liter Kulturmedium.

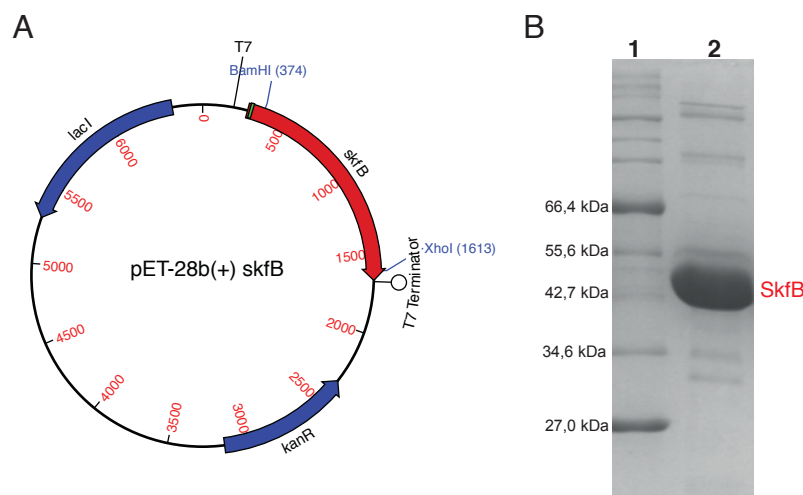


Abbildung 4.29: Klonierung und Reinigung von SkfB. (A) Das *skfB*-Gen wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme BamHI und XhoI in den pET-28a(+)-Vektor kloniert. (B) SDS-PAGE von aerob gereinigten SkfB. 1: Marker; 2: konzentrierte SkfB-Fractionen.

4.2.2 Expression und Reinigung der SkfB^{C117A C121A C124A}-Mutante

Die SkfB^{C117A C121A C124A}-Mutante, in der die drei Cysteine des CXXXCXXC-Motivs gegen Alanine ausgetauscht sind, wurde mit Hilfe der SLIM-Methode generiert. Die Expression und Reinigung erfolgte analog der Expression und Reinigung von SkfB. Die Ausbeute lag mit ca. 19 mg Protein pro Liter Bakterienkultur unter der von SkfB.

4.2.3 Bestimmung des Eisen- und Schwefelgehalts von den SkfB-Spezies

Der Eisen- und Schwefelgehalt von SkfB wurde während dieser Doktorarbeit nicht erneut bestimmt. Die Daten sind der Diplomarbeit von Leif Flühe entnommen (Flühe, 2010). In nicht rekonstituierten SkfB wurden 0.57 ± 0.01 Äquivalente Eisen und 0.57 ± 0.01 Äquivalente Schwefel pro Äquivalent Protein gefunden. Da dies ein relativ geringer Eisen- bzw. Schwefelgehalt für ein Radical SAM Enzym ist, wurde SkfB chemisch rekonstituiert. Nach Rekonstitution wurde ein Eisen- bzw. Schwefelgehalt von 8.19 ± 0.07 bzw. 8.36 ± 0.14 Äquivalenten gemessen. Der hohe Gehalt von jeweils ca. 8 Äquivalenten deutet auf das Vorhandensein eines zweiten Fe/S-Clusters hin. Die Farbe der Enzymlösung änderte sich wie bei AlbA während der Rekonstitution von einem Hellbraun zu einem Kastanienbraun.

Um die Existenz eines zweiten Fe/S-Clusters beweisen zu können wurde der Eisengehalt der rekonstituierten SkfB^{C117A C121A C124A}-Variante im Rahmen dieser Doktorarbeit bestimmt. Die Eisenmenge wurde dabei mit der in Kapitel 4.1.3 beschriebenen Eichgeraden aus der gemessenen optischen Dichte bei 593 nm bestimmt (Tabelle 4.5). Es wurde ein durchschnittlicher Eisengehalt von 4.51 ± 0.16 Äquivalenten pro Äquivalent Protein bestimmt. Da in der SkfB-Mutante die drei Cysteinreste, die den für die reduktive SAM-Spaltung benötigten [4Fe-4S]-Cluster koor-

dinieren, gegen Alanin ausgetauscht wurden, deutet der bestimmte Eisengehalt von ungefähr vier Äquivalenten auf die Präsenz mindestens eines weiteren Fe/S-Clusters hin.

Tabelle 4.5: Bestimmung des Eisengehalts der rekonstituierten SkfB^{C117A C121A C124A}-Variante

n (SkfB ^{C117A C121A C124A})	OD ₅₉₃	n (Fe ³⁺)	Verhältnis SkfB ^{C117A C121A C124A} .Fe ³⁺
1.49 nmol	0.210	6.27 nmol	1 : 4.21
2.23 nmol	0.333	9.94 nmol	1 : 4.45
2.98 nmol	0.445	13.3 nmol	1 : 4.47
2.98 nmol	0.459	13.7 nmol	1 : 4.61
3.72 nmol	0.600	17.9 nmol	1 : 4.82

4.2.4 Bestimmung der SAM-Spaltungsaktivität von SkfB

Die SAM-Spaltungsaktivität von SkfB wurde untersucht, um den definitiven Beweis zu erbringen, dass es sich bei dem Protein um ein Radical SAM Enzym (Abbildung 4.3) handelt. Wie bei AlbA wurden vier Assays durchgeführt, die anschließend mittels HPLC-MS auf die Produktion von Met und 5'-dA analysiert wurden (Abbildung 4.30).

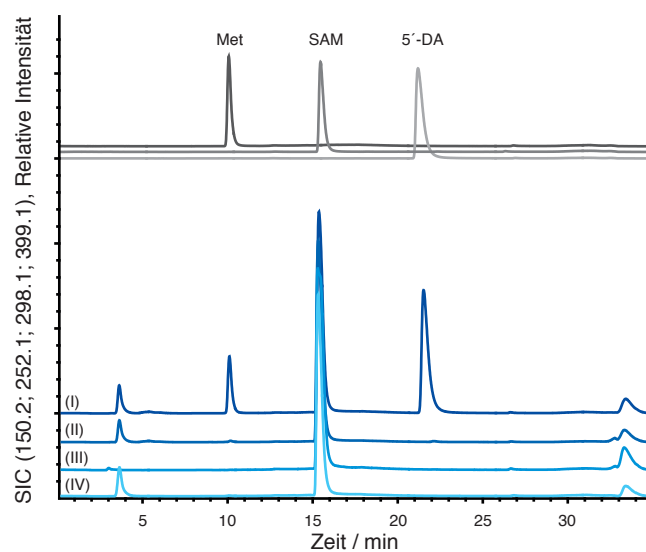


Abbildung 4.30: Single-Ion Chromatogramme (SICs) der Assays zur Bestimmung der SAM-Spaltungsaktivität von SkfB. Die grauen Chromatogramme entsprechen Standards von Met, SAM, und 5'-dA. Die blauen Chromatogramme zeigen die HPLC-MS-Analysen der drei Kontrollen (II – IV) und des eigentlichen Assays (I).

Die vier Assays beinhalteten drei Kontrollreaktionen: 1.) eine Kontrolle ohne SkfB, aber mit SAM und Natriumdithionit (Chromatogramm IV), 2.) eine Kontrolle mit rekonstituiertem SkfB und SAM, aber ohne Reduktionsmittel (Chromatogramm III) und 3.) eine Kontrolle mit nicht rekonstituiertem SkfB, SAM und Natriumdithionit als Reduktionsmittel (Chromatogramm II). Der Assay aus Chromatogramm I beinhaltete rekonstituiertes SkfB, SAM und DT. In den ersten beiden Kontrollen (Chromatogramme III und IV) ist keine SAM-Spaltung zu detektieren. Wurde nicht rekonstituiertes SkfB eingesetzt, ist die Bildung sehr kleiner Mengen Met und 5'-dA zu beobachten. Unter Verwendung von rekonstituiertem SkfB wurden große Mengen an 5'-dA und Met gebildet.

4.2.4.1 Zeitabhängigkeit der von SkfB katalysierten reduktiven SAM-Spaltung

Die Zeitabhängigkeit der von rekonstituierten SkfB katalysierten reduktiven SAM-Spaltung wurde untersucht, um Rückschlüsse auf die SAM-Spaltungsaktivität bei Abwesenheit des Vorläuferpeptids des Sporulation Killing Factors ziehen zu können. In den Assays wurden jeweils 10 μM SkfB, 300 μM SAM und 300 μM DT eingesetzt. Nach der jeweiligen Zeiteinheit wurden die Assays mit Ameisensäure zu einer Konzentration von 5% versetzt, um die Reaktion zu stoppen. Zur Erfassung der SAM-Spaltungsaktivität wurde die Zeitabhängigkeit der Bildung von 5'-dA beobachtet. Dafür wurde die jeweilige 5'-dA-Konzentration aus der Fläche des 5'-dA-Peaks im UV-Chromatogramm bei 260 nm mit Hilfe der in der Diplomarbeit von Leif Flühe bestimmten, Eichgeraden (Flühe, 2010) berechnet. Für jeden Zeitpunkt wurde der Durchschnittsumsatz von drei Assays verwendet. Die erhaltenen Daten sind in Abbildung 4.31 zusammengefasst.

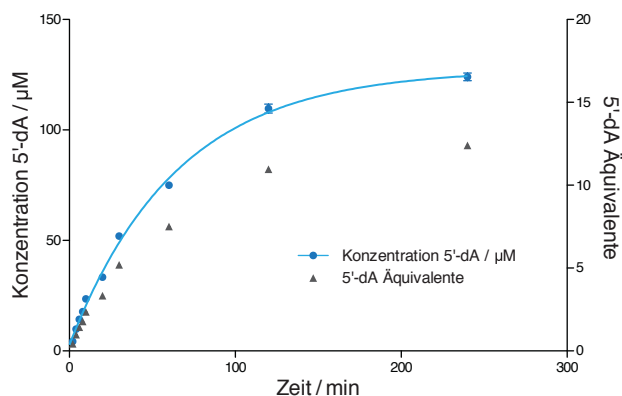


Abbildung 4.31: Zeitabhängigkeit der von SkfB katalysierten 5'-dA-Bildung aus SAM in Abwesenheit des SKF Vorläuferpeptids. SkfB war in der Lage nach 4 h Reaktionszeit ungefähr 12 Äquivalente SAM in 5'-dA zu spalten. Zu diesem Zeitpunkt hatte die Bildung von 5'-dA die Sättigung erreicht. Nach ca. 4 Minuten hatte SkfB ein Äquivalent SAM gespalten.

Anfänglich ist eine schnelle Bildung von 5'-dA zu beobachten. Das erste Äquivalent SAM wird unter den Reaktionsbedingungen in ungefähr 4 min umgesetzt. Eine Sättigung an gebildeten 5'-dA ist nach 4 h Reaktionszeit bei einer Konzentration von ca. 120 μ M zu beobachten. Dies entspricht einem Umsatz von 12 Äquivalenten SAM pro Äquivalent SkfB. Ungefähr 36% des eingesetzten SAM wurden gespalten.

4.2.4.2 Bestimmung der SAM-Spaltungsaktivität der SkfB^{C117A C121A C124A}-Variante

Die SAM-Spaltungsaktivität der SkfB^{C117A C121A C124A}-Mutante wurde bestimmt, um beweisen zu können, dass die drei im CXXXCXXC vorkommenden Cysteinreste für die Koordination des für die reduktive SAM-Spaltung benötigten [4Fe-4S]-Clusters verantwortlich sind. Die *Single-Ion*-Chromatogramme der HPLC-MS-Analysen der durchgeführten Assays sind in Abbildung 4.32 gezeigt. Es wurden zwei Kontrollen (Chromatogramm I und II), dessen Zusammensetzung der ersten und zweiten Kontrolle mit SkfB entsprachen, durchgeführt. Wie erwartet, ist in den Kontrollen keine Spaltung von SAM in Met und 5'-dA zu beobachten. Im Assay mit rekonstituierten SkfB^{C117A C121A C124A}, SAM und Natriumdithionit konnten ebenfalls keine SAM-Spaltungsprodukte identifiziert werden. Der für die SAM-Spaltung benötigte Fe/S-Cluster ist demnach über die drei Cysteinreste des CXXXCXXC-Motivs koordiniert.

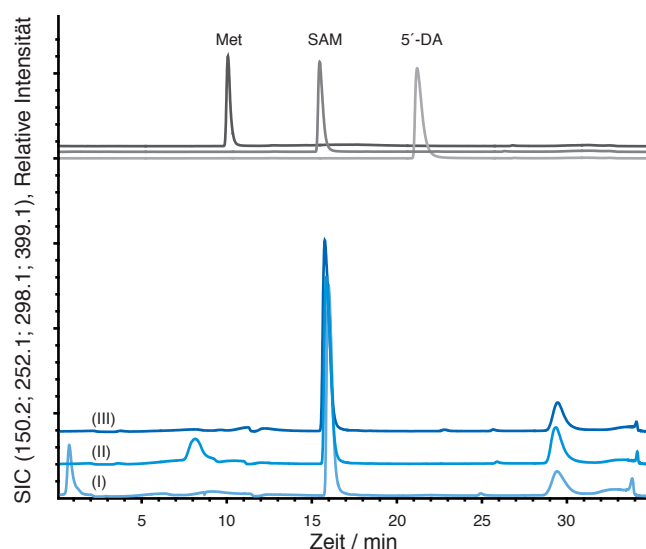


Abbildung 4.32: *Single-Ion*-Chromatogramme (SICs) der SAM-Spaltungsaktivitätsassays der SkfB^{C117A C121A C124A}-Variante (blau). Die grauen Chromatogramme zeigen Standards von Met, SAM und 5'-dA.

4.2.5 Spektroskopische Charakterisierung der in SkfB gebundenen Fe/S-Cluster

Durch die SAM-Spaltungsaktivitätsassays mit der SkfB^{C117A C121A C124A}-Variante wurde gezeigt, dass der für die SAM-Spaltung benötigte [4Fe-4S]-Cluster über die drei Cysteinreste Cys117,

Cys121 und Cys124 koordiniert wird. Die Mutante verfügt aber dennoch über einen Eisengehalt von 4.51 ± 0.16 Äquivalenten, was auf die Präsenz mindestens eines weiteren Fe/S-Clusters hindeutet. Zur Charakterisierung der in SkfB gebundenen Fe/S-Cluster wurde zunächst das Wild-Typ-Protein per UV-Vis- und EPR-Spektroskopie untersucht (Abbildung 4.33). Alle weiteren Experimente wurden mit rekonstituierten Proteinen durchgeführt. Es wird daher im Folgenden nicht mehr explizit auf den rekonstituierten Zustand von SkfB und dessen Varianten hingewiesen.

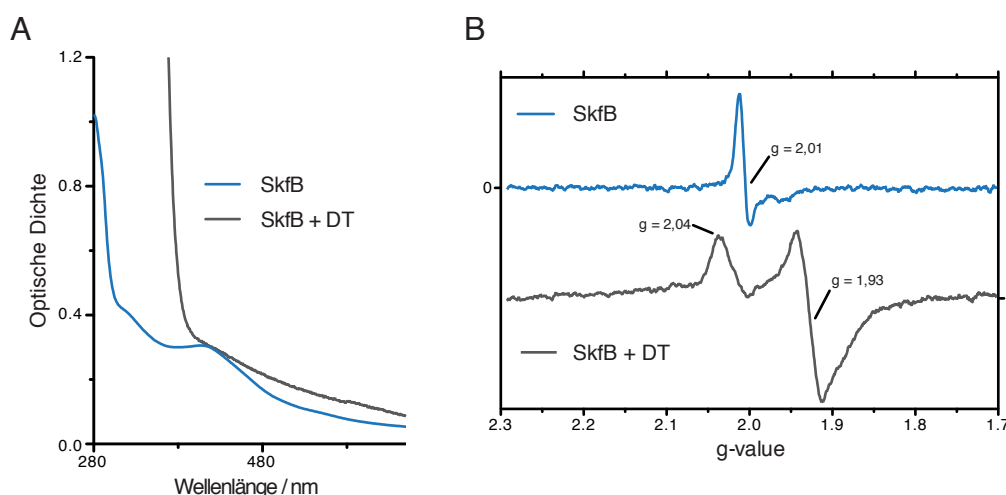


Abbildung 4.33: Spektroskopische Charakterisierung von SkfB. (A) Das UV-Vis-Spektrum von nicht reduziertem SkfB (blau) zeigt Absorptionsbanden bei 325 nm und 410 nm, wohingegen das UV-Vis-Spektrum von reduziertem SkfB (grau) keine charakteristischen Absorptionsbanden besitzt. (B) EPR-Spektren von reduziertem (grau) und nicht reduziertem (blau) SkfB. Im Spektrum der nicht reduzierten Spezies ist ein Signal bei $g = 2.01$ zu detektieren. Das reduzierte Protein verfügt über EPR-Signale bei $g = 2.04$ und $g = 1.93$.

Das UV-Vis-Spektrum von nicht reduziertem SkfB (Abbildung 4.33a, blau) zeigt die für Fe/S-Cluster-haltigen Proteine typischen Absorptionsbanden bei 325 nm und 410 nm. Die Absorptionsbande bei 410 nm ist charakteristisch für [4Fe-4S]-Cluster enthaltende Proteine (Ugulava et al., 2000). Das UV-Vis-Spektrum von reduziertem SkfB (grau) zeigt keine spezifischen Absorptionsbanden. Im Gegensatz dazu ist reduziertes SkfB EPR-aktiv (Abbildung 4.33b, grau). Im EPR-Spektrum sind deutliche Signale bei $g = 2.04$ und $g = 1.93$ zu detektieren. Die gemessenen g -Werte sind charakteristisch für [4Fe-4S]-Cluster enthaltene Proteine (Sweeney and Rabinowitz, 1980). Im EPR-Spektrum von nicht reduziertem SkfB ist ein Signal bei $g = 2.01$ zu beobachten. Der in Radical SAM Enzymen enthaltene $[4Fe-4S]^{2+}$ ist eigentlich EPR inaktiv. Da nur drei der vier Eisenatome durch Cysteine koordiniert sind, kann es jedoch zu einer Degradierung des Clusters kommen, so dass ein $[3Fe-4S]^+$ entsteht, der ein EPR-Signal mit $g = 2.01$ besitzt (Duschene and Broderick, 2010). Die spektroskopischen Eigenschaften von SkfB deuten auf das Vorhandensein von zwei [4Fe-4S]-Clustern hin. Um die Beschaffenheit des zweiten Clus-

ters genau bestimmen zu können, wurde die SkfB^{C117A C121A C124A}-Variante ebenfalls per UV-Vis- und EPR-Spektroskopie charakterisiert (Abbildung 4.34).

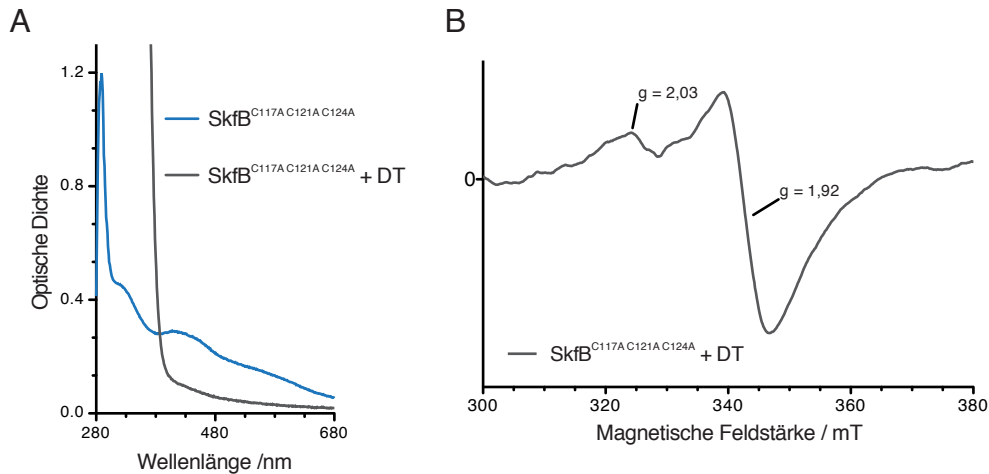


Abbildung 4.34: Spektroskopische Charakterisierung der SkfB^{C117A C121A C124A}-Mutante. (A) UV-Vis-Spektren von reduziertem (grau) und nicht reduziertem (blau) SkfB^{C117A C121A C124A}. Im Spektrum der nicht reduzierten SkfB-Mutante sind Absorptionsbanden bei 325 nm und 410 nm zu identifizieren. (B) EPR-Spektrum der reduzierten SkfB-Variante. Es sind die für [4Fe-4S]-Cluster typischen Signale bei $g = 2.03$ und $g = 1.92$ zu beobachten.

Das UV-Vis Spektrum von reduziertem SkfB^{C117A C121A C124A} (Abbildung 4.34a, grau) zeigt keine spezifischen Absorptionsbanden. Im Gegensatz dazu ist die nicht reduzierte SkfB-Mutante UV-Vis-aktiv (blau) und besitzt Absorptionsbanden bei 325 nm und 410 nm. Dieses Ergebnis legt nahe, dass SkfB einen zweiten [4Fe-4S]-Cluster koordiniert, da die beobachteten Absorptionsbanden charakteristisch für [4Fe-4S]²⁺-Cluster sind (Ugulava et al., 2000). Das EPR-Spektrum von reduziertem SkfB^{C117A C121A C124A} unterstützt diese Vermutung (Abbildung 4.34b). Es sind die für [4Fe-4S]-Cluster charakteristischen Signale bei $g = 2.03$ und $g = 1.92$ zu identifizieren.

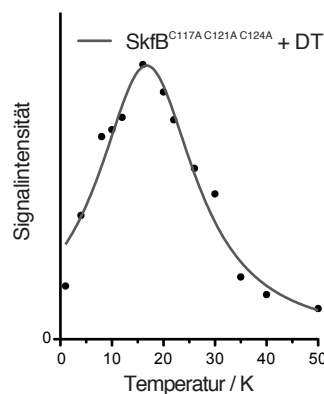


Abbildung 4.35: Temperaturabhängigkeit der Intensität des EPR-Signals von reduzierten SkfB^{C117A C121A C124A}. Die maximale Intensität ist bei einer Temperatur von ungefähr 20 K zu beobachten.

Um die Präsenz von [2Fe-2S]-Clustern ausschließen zu können, wurde die Temperaturabhängigkeit der Intensität des EPR-Signals bei $g = 1.92$ untersucht (Abbildung 4.35). Die maximale Intensität des EPR-Signals wurde bei einer Temperatur von ca. 20 K beobachtet, was charakteristisch für [4Fe-4S]-Cluster enthaltende Proteine ist. [2Fe-2S]-Cluster hingegen besitzen eine maximale Intensität bei einer deutlich höheren Temperatur von 60 K bis 70 K (Ugulava et al., 2001a). Aus diesem Grund ist die Anwesenheit von [2Fe-2S]-Clustern auszuschließen. SkfB besitzt demnach einen zweiten [4Fe-4S]-Cluster.

4.2.6 Herstellung des Vorläuferpeptids des Sporulation Killing Factors

Das Vorläuferpeptid des Sporulation Killing Factors SkfA wurde im Gegensatz zu SboA nicht fertig synthetisiert erworben, sondern über heterologe Expression in *E. coli* hergestellt (Abbildung 4.36). Dadurch war es möglich, verschiedenste Substitutionen innerhalb der Aminosäuresequenz einzufügen und die daraus resultierenden SkfA-Varianten *in vitro* auf die von SkfB katalysierte Thioetherbrückenbildung zu untersuchen. Zur Herstellung von SkfA wurde zunächst *skfA* aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* 168 per PCR amplifiziert und in den pET-48b(+)-Vektor kloniert. Dadurch wurde auf DANN-Ebene ein Thioredoxin-SkfA-Fusionsgen erhalten, das durch die Sequenz der HRV-3C-Protease-Schnittstelle verbunden ist. Durch eine anschließende SLIM-Mutagenese wurde die Sequenz der HRV-3C-Protease-Schnittstelle durch die Sequenz der TEV-Protease-Schnittstelle ersetzt. Anschließend wurden *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen mit dem erhaltenen pET-48b(+) *skfA*-Plasmid transformiert. Die nachfolgende Expression des Thioredoxin-SkfA-Fusionsproteins wurde in LB-Medium durchgeführt. Nach erfolgreicher Reinigung per Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie wurde das Fusionsprotein durch Verdau mit der TEV-Protease gespalten. Es wurde Thioredoxin und eine SkfA-Spezies, die am N-Terminus über einen zusätzlichen Serinrest verfügt (SerSkfA), erhalten. Diese Vorläuferpeptidvariante wurde mittels analytischer HPLC final gereinigt. SerSkfA enthaltende Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert. Die Ausbeute an SerSkfA betrug ungefähr 1 mg pro Liter Expressionskultur.

Zur Synthese von SerSkfA-Varianten wurde die Basensequenz des pET-48b(+) *skfA*-Plasmids mit Hilfe der SLIM-Methode mutiert. Anschließend wurden die neu erhaltenen pET-48b(+) *skfA*^{Variante}-Vektoren in *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen transformiert. Das jeweilige Thioredoxin-SkfA^{Variante}-Fusionsprotein wurde in LB-Medium exprimiert, per Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie gereinigt und mit Hilfe der TEV-Protease gespalten. Die finale Reinigung der Vorläuferpeptidvarianten gelang durch analytische HPLC, wie Abbildung 4.37 für die SerSkfA^{M12A}-Mutante zeigt. Eine Liste der generierten SerSkfA-Varianten findet sich in Tabelle A.2 und eine Übersicht über die Chromatogramme der HPLC-Reinigungen in den Abbildungen A.16 und A.17. Die Ausbeute an SerSkfA^{Variante} betrug jeweils ungefähr 1 mg pro Liter Expressionskultur.

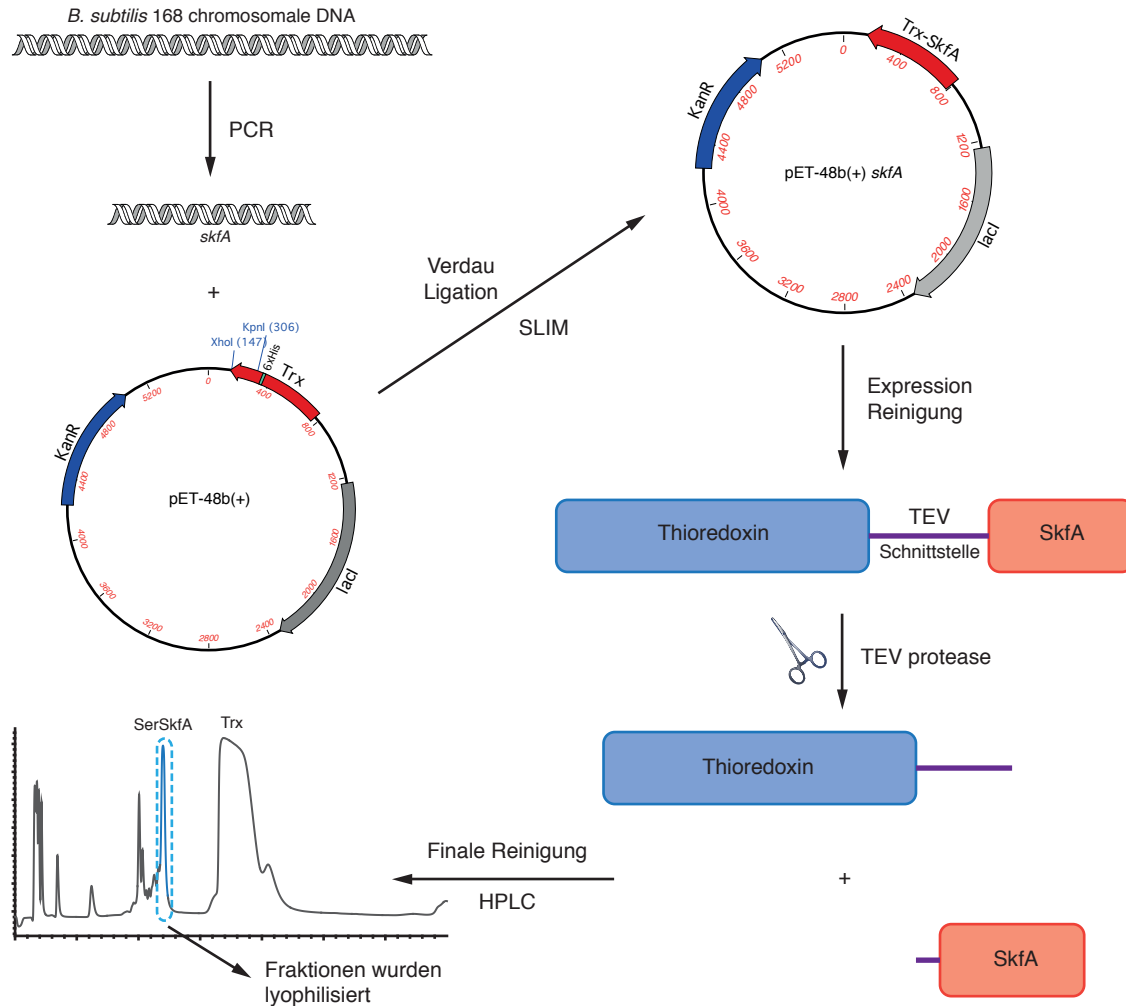


Abbildung 4.36: Strategie zur Gewinnung des SKF-Vorläuferpeptids SerSkfA. Zunächst wurde das *skfA*-Gen in den pET-48b(+)-Vektor kloniert. Das erhaltene *trx-skfA*-Fusionsgen wurde anschließend mittels SLIM-Methode modifiziert. Nach erfolgreicher Expression in *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen wurde das Thioredoxin-SkfA-Fusionsprotein mit Hilfe der TEV-Protease in zwei Komponenten getrennt. Die so erzeugte SkfA-Variante verfügt über einen zusätzlichen N-terminalen Serinrest (SerSkfA). Abschließend wurde SerSkfA mittels HPLC gereinigt und lyophilisiert.

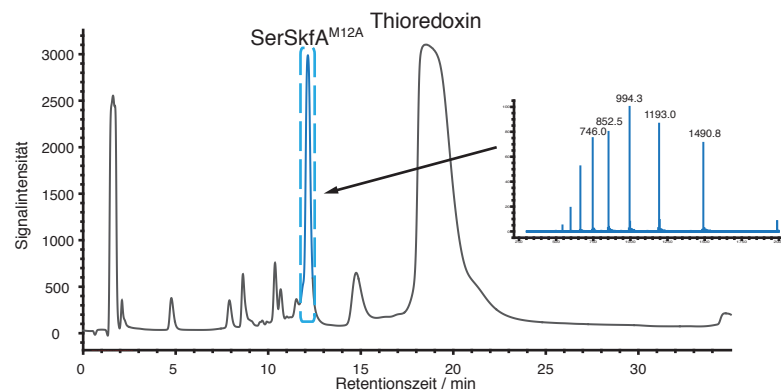


Abbildung 4.37: HPLC UV-Chromatogramm der finalen Reinigung der SerSkfA^{M12A}-Variante. Das Massenspektrum des Peaks bei einer Retentionszeit von 12.1 min ist ebenfalls mit angegeben. Es ist mit dem vorhergesagten Massenspektrum von SerSkfA^{M12A} identisch.

4.2.7 Massenanalytik des SerSkfA Vorläuferpeptids

Zur Vorbereitung der Vorläuferpeptidmodifikationsassays mit SkfB wurde SerSkfA zunächst per HPLC-HRMS analysiert, um eine auf das Vorläuferpeptid angepasste Methode zu entwickeln. Dazu wurden 50 μL einer 200 μM SerSkfA-Lösung in die HPLC-Anlage injiziert und mit dem in Kapitel 3.5.5.1 beschriebenen Gradienten getrennt. Das erhaltene Massenspektrum des voraussichtlichen Vorläuferpeptid-Peaks ist in Abbildung 4.38a gezeigt.

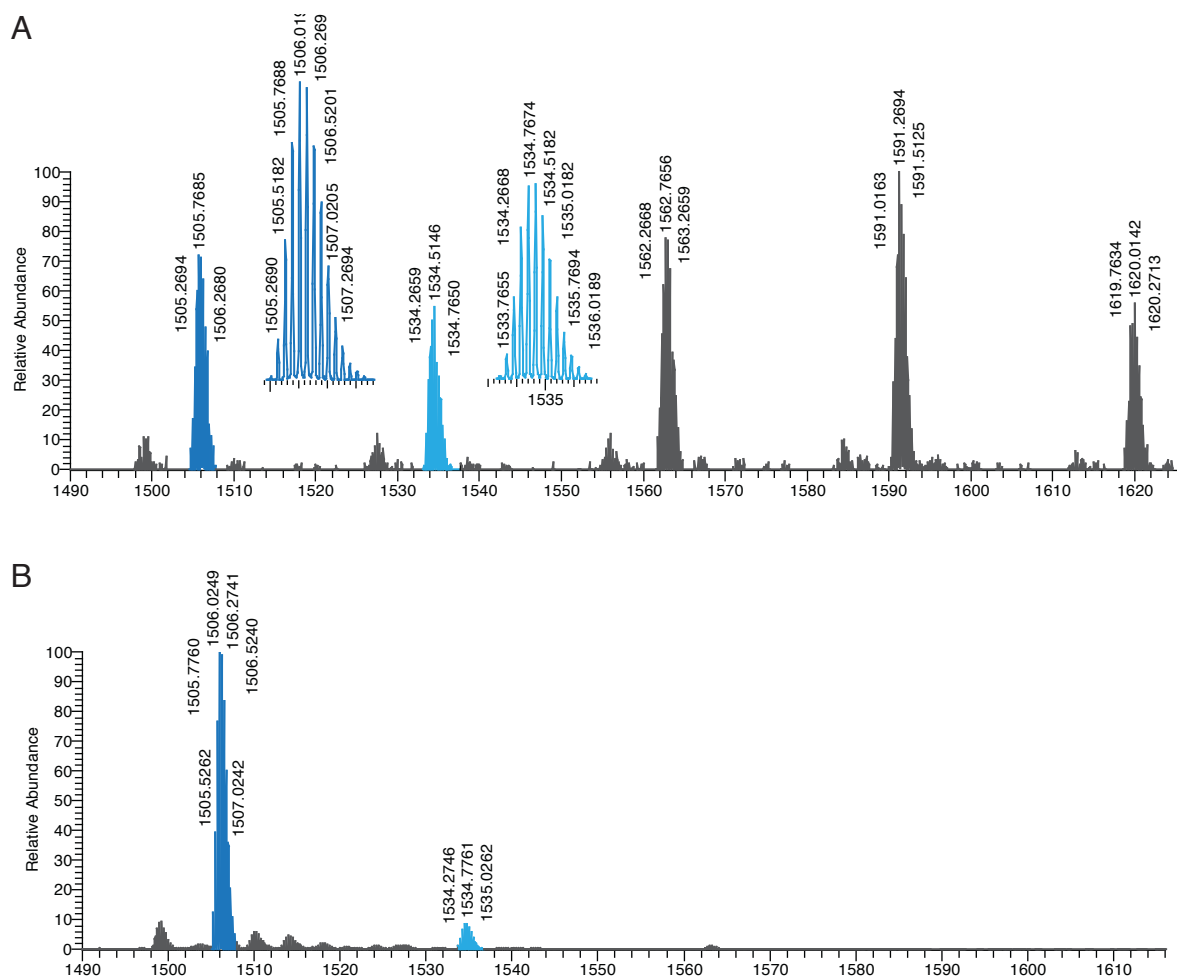


Abbildung 4.38: Massenspektren der HPLC-HRMS des SKF-Vorläuferpeptids SerSkfA. (A) Massenspektrum der Analyse von SerSkfA mit der ursprünglichen Methode zur Analyse von SboA. Es sind mehrere Massensignale mit einer Differenz von 28.49 Masseneinheiten, was einer dekonvolvierten Massendifferenz von 113.99 u entspricht, zu detektieren. Diese Differenz entspricht der Masse von TFA. Bei den beobachteten Verbindungen handelt es sich demnach um SerSkfA-TFA-Addukte. (B) Massenspektrum der Analyse von SerSkfA mit einer *in-source*-Fragmentierung von 30 V. Die Intensität der TFA-Addukte wurde auf ein Minimum reduziert. Es ist fast ausschließlich SerSkfA mit einem m/z -Verhältnis von $[M+4H]^{4+} = 1505.2690$ zu detektieren.

Es zeigen sich mehrere Massensignale, die mehreren Verbindungen zugeordnet werden müssen, da alle beobachteten Signale vierfach positiv geladenen Spezies entsprechen. Der Verbindung mit dem leichtesten Massenspektrum ist ein m/z -Verhältnis von $[M+4H]^{4+} = 1505.2690$

zuzuordnen. Es stimmt mit dem berechneten m/z -Verhältnis von $[M+4H]^{4+} = 1505.2706$ für SerSkfA überein. Interessant ist, dass sich alle weiteren Massenspektren in einer Differenz von ungefähr 28.49 Masseneinheiten unterscheiden. Da es sich bei den detektierten Verbindungen jeweils um vierfach positiv geladene Spezies handelt, liegt die tatsächliche Massendifferenz bei ungefähr 113.99 u, was der exakten Masse von TFA ($[M] = 113.9928$) entspricht. Bei den weiteren Verbindungen scheint es sich demnach um SerSkfA-TFA-Addukte zu handeln, die während des Ionisationsvorgangs gebildet wurden. Aus diesem Grund wurde die Methode durch eine *in-source*-Fragmentierung mit zunächst 10 V, 20 V, 30 V und 40 V erweitert. Die resultierenden Massenspektren sind in den Abbildungen 4.38b und A.18 zu sehen. Ab einer *in-source*-Fragmentierung von 30 V sind die Massensignale der SerSkfA-TFA-Addukte auf ein Minimum reduziert. Die Methode zur Analyse der Vorläuferpeptidmodifikationsassays mit SkfB wurde deshalb dahingehend geändert.

4.2.8 Vorläuferpeptidmodifikationsassays mit SerSkfA und SkfB

Es wurden vier Vorläuferpeptidmodifikationsassays mit SerSkfA durchgeführt. Zu diesen zählten 1.) eine Kontrolle mit Zugabe von DT und SAM, aber ohne die Zugabe von SkfB, 2.) eine weitere Kontrolle mit zusätzlicher Zugabe von Iodacetamid nach vierstündiger Inkubation, 3.) der Reaktionsassay mit Zugabe von DT, SAM und SkfB und 4.) der Reaktionsassay mit zusätzlicher Iodacetamidzugabe nach einer Reaktionszeit von 4 h. Die Zugabe von Iodacetamid wurde durchgeführt, um zwischen Thioether- und Disulfidbrückenbildung unterscheiden zu können (Abbildung 4.11). Im Unterschied zu den Modifikationsassays mit SboA (Kapitel 4.1.8) wurden die Assays mit SerSkfA anschließend nicht mit Methanol extrahiert, sondern wurden absichtlich durch Luftzugabe oxidiert. Dies sollte in der Kontrolle zu einer einfachen Disulfidbrückenbildung führen. Im Reaktionsassay sollte hingegen die Bildung einer zweifach verbrückten SerSkfA-Spezies zu beobachten sein, bestehend aus einem Thioether und einer Disulfidbrücke. Falls SkfB nicht in der Lage war, die Thioetherbrückenbildung zu katalysieren sollte im Assay ebenfalls nur einfach verbrücktes SerSkfA zu finden sein. Durch die Kontrolle und den Reaktionsassay mit Zugabe von Iodacetamid konnte dann genau zwischen Disulfidbrücke und Thioetherbrücke in den unterschiedlich verknüpften SerSkfA-Derivaten unterschieden werden. Die HPLC-HRMS-Analyse der Kontrolle und des Reaktionsassays ohne Zugabe von Iodacetamid ist in Abbildung 4.39 gezeigt. Im extrahierten Ionenchromatogramm der Kontrolle (Abbildung 4.39a) ist ein Peak mit einer Retentionszeit von 12.8 min zu identifizieren. Die Verbindung (Abbildung 4.39c) besitzt ein m/z -Verhältnis von $[M+4H]^{4+} = 1504.776$, was dem m/z -Verhältnis von einfach verbrückten SerSkfA von $[M+4H]^{4+} = 1504.7667$ entspricht. Im Reaktionsassay (Abbildung 4.39b) wurde ein neuer Peak mit einer Retentionszeit von 14.7 min detektiert. Die Verbindung besitzt ein m/z -Verhältnis von $[M+4H]^{4+} = 1504.2708$, was dem m/z -Verhältnis von 2b-SerSkfA

von $[M+4H]^{4+} = 1504.2628$ entspricht. Die HPLC-HRMS-Analysen der Kontrolle und des Reaktionsassays mit Iodacetamidzugabe finden sich in Abbildung A.19c&d. In der Kontrolle wurde im extrahierten Ionenchromatogramm eine Verbindung mit einer Retentionszeit von 13.2 min identifiziert. Die zugehörige SerSkfA-Spezies besitzt ein m/z -Verhältnis von $[M+4H]^{4+} = 1548.0331$ und ist damit dreifach carbamidomethyliertem SerSkfA zuzuordnen, was ein berechnetes m/z -Verhältnis von $[M+4H]^{4+} = 1548.0367$ besitzt. Bei der in der Kontrolle beobachteten Verbrückung handelt es sich demnach um eine Disulfidbindung. Im extrahierten Ionenchromatogramm der HPLC-HRMS-Analyse des Reaktionsassays findet sich zwei Peaks mit Retentionszeiten von 11.7 min und 13.0 min. Die Verbindung mit einer Retentionszeit von 13.0 entspricht dreifach carbamidomethyliertem SerSkfA. Die Verbindung mit einer Retentionszeit von 11.7 min besitzt ein m/z -Verhältnis von $[M+4H]^{4+} = 1533.2827$. Dieses m/z -Verhältnis ist in Übereinstimmung mit dem von einfach verbrücktem SerSkfA, das zusätzlich über zwei carbamidomethylierte Cysteinreste verfügt ($[M+4H]^{4+} = 1533.2774$). Bei der zusätzlichen im Reaktionsassay beobachteten Verbrückung handelt es sich demnach um einen Thioether. SkfB ist daher in der Lage, die Thioetherbrückenbildung in SerSkfA zu katalysieren.

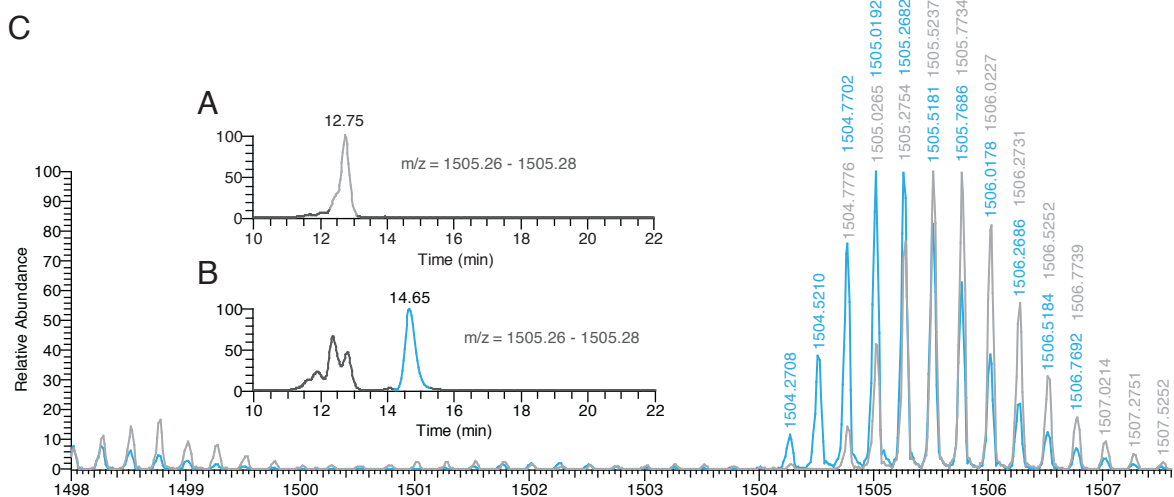


Abbildung 4.39: HPLC-HRMS-Analyse der Kontrolle und des Reaktionsassays mit SerSkfA. (A) Extrahiertes Ionenchromatogramm der Kontrolle. Die extrahierte Masse ist jeweils mit angegeben. (B) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Reaktionsassays. (C) Massenspektren der Peaks in den extrahierten Ionenchromatogrammen. Die Massenspektren sind farblich mit den in (A) und (B) gezeigten Peaks verknüpft.

4.2.9 Vorläuferpeptidmodifikationsassays mit SerSkfA-Varianten

Um die Substratspezifität von SkfB gegenüber der Donor- und Akzeptoraminosäure zu untersuchen, wurden insgesamt 13 SerSkfA-Varianten generiert: zwei Cys4-Mutanten, eine Cys4 zu Met12 Austauschmutante und zehn Met12-Varianten. Die SerSkfA^{C4A}-Variante wurde erzeugt,

um die Regiospezifität der Thioetherbrückenbildung bezüglich des Cysteindonors zu überprüfen, da die Cysteine Cys1 und Cys16 ebenfalls als Donor in Frage kommen könnten. Es wurden, wie für SerSkfA, vier verschiedene Assays durchgeführt. Die Ergebnisse der HPLC-HRMS-Analyse der Assays ist in den Abbildungen 4.40 und A.20 zu finden. Nach Oxidation der Proben mit Luftsauerstoff konnte in der Kontrolle (Abbildung A.20a) eine SerSkfA^{C4A}-Spezies mit einer Retentionszeit von 12.5 min und einem m/z-Verhältnis von $[M+4H]^{4+} = 1496.7785$ nachgewiesen werden. Dieselbe SerSkfA^{C4A}-Spezies wurde im Reaktionsassay (Abbildung A.20b) nachgewiesen ($t_R = 12.5$ min; $[M+4H]^{4+} = 1496.7790$). Bei dieser Verbindung handelt es sich um einfach verbrücktes SerSkfA^{C4A} mit einem berechneten m/z-Verhältnis von $[M+4H]^{4+} = 1496.7737$. Um zu überprüfen, dass in beiden Verbindungen jeweils eine Disulfidbrücke vorlag, wurden ebenfalls Kontrolle und Reaktionsassay mit Iodacetamidzugabe durchgeführt (Abbildung 4.40a-c). Im extrahierten Ionenchromatogramm der Kontrolle mit Iodacetamidzugabe ist ein Peak mit einer Retentionszeit von 13.8 min zu identifizieren. Die detektierte Verbindung besitzt ein m/z-Verhältnis $[M+4H]^{4+} = 1529.7921$. Im Reaktionsassay ist ebenfalls dieselbe SerSkfA^{C4A}-Spezies mit einer Retentionszeit von 13.8 min und einem m/z-Verhältnis von $[M+4H]^{4+} = 1529.7873$ zu beobachten. Bei beiden SerSkfA^{C4A}-Derivaten handelt es sich um zweifach carbamidomethyliertes SerSkfA^{C4A}, das ein berechnetes m/z-Verhältnis von $[M+4H]^{4+} = 1525.7883$ besitzt.

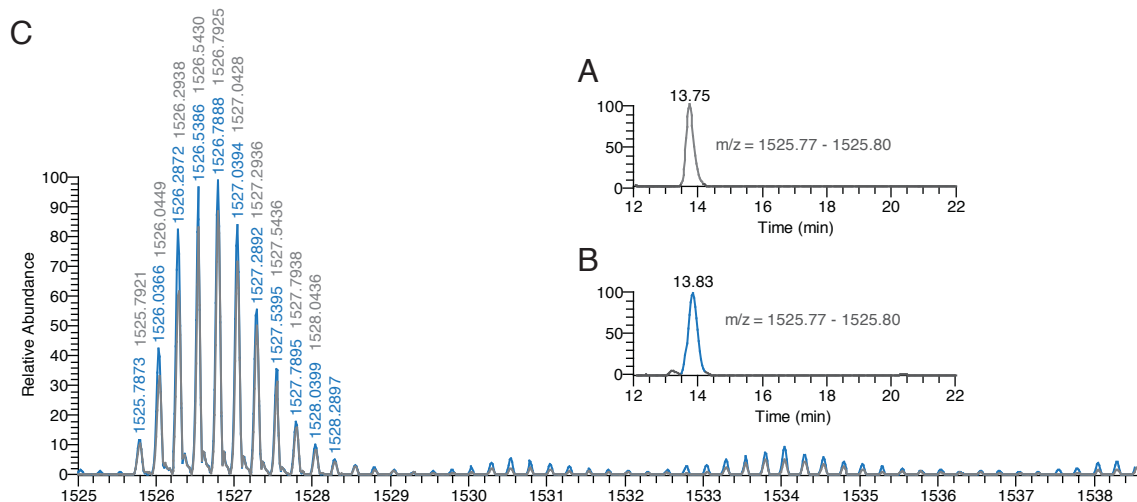


Abbildung 4.40: HPLC-HRMS-Analyse der SerSkfA^{C4A}-Assays mit Iodacetamidzugabe. (A) Das extrahierte Ionenchromatogramm der Kontrolle mit Iodacetamid zeigt einen Peak bei einer Retentionszeit von 13.8 min. (B) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Reaktionsassays mit Iodacetamid. Es ist ebenfalls eine Verbindung mit einer Retentionszeit von 13.8 zu identifizieren. (C) Massenspektren der Verbindungen aus Kontrolle und Assay. Sie sind jeweils farblich den extrahierten Peaks zuzuordnen.

Um Rückschlüsse auf den Mechanismus der Thioetherbildung ziehen zu können, wurde die SerSkfA^{C4M M12C}-Variante erstellt. In dieser Variante wurde die Position der Akzeptoraminosäure

mit der des Donors vertauscht. Falls SkfB in der Lage ist, die Bildung des Thioethers zu katalysieren, entstünde eine Bindung in umgekehrter Richtung. Die Ergebnisse der HPLC-HRMS-Analyse der Assays sind in den Abbildungen 4.41 und A.21 gezeigt. In der Kontrolle (Abbildung A.21a) ist nach Oxidation eine SerSkfA^{C4M M12C}-Spezies mit einem m/z-Verhältnis von $[M+4H]^{4+} = 1504.7671$ und einer Retentionszeit von 12.2 min zu detektieren. Im Reaktionsassay (Abbildung A.21b) ist ebenfalls eine Verbindung mit einem fast identischen m/z-Verhältnis von $[M+4H]^{4+} = 1504.7619$ und einer Retentionszeit von 12.7 min zu identifizieren. Bei beiden Spezies handelt es sich um einfach verbrückte SerSkfA^{C4M M12C}-Derivate ($[M+4H]^{4+} = 1504.7667$). Um zwischen einer Thioether- und Disulfidbildung unterscheiden zu können, wurden die Assays nach der Reaktion mit Iodacetamid versetzt (Abbildung 4.41a-c). Im extrahierten Ionenchromatogramm der Kontrolle ist ein Peak bei 13.0 min zu beobachten. Die zugehörige Verbindung besitzt ein m/z-Verhältnis von $[M+4H]^{4+} = 1548.0437$. Die SerSkfA^{C4M M12C}-Spezies, die im extrahierten Ionenchromatogramm der HPLC-HRMS-Analyse des Reaktionsassays bei 13.1 min identifiziert wurde besitzt ein ähnliches m/z-Verhältnis von $[M+4H]^{4+} = 1548.0380$. Das m/z-Verhältnis entspricht in beidem Fällen dem von dreifach carbamidomethyliertem SerSkfA^{C4M M12C} ($[M+4H]^{4+} = 1548.0367$). SkfB war demnach nicht in der Lage, die Bildung eines umgedrehten Thioethers zu katalysieren.

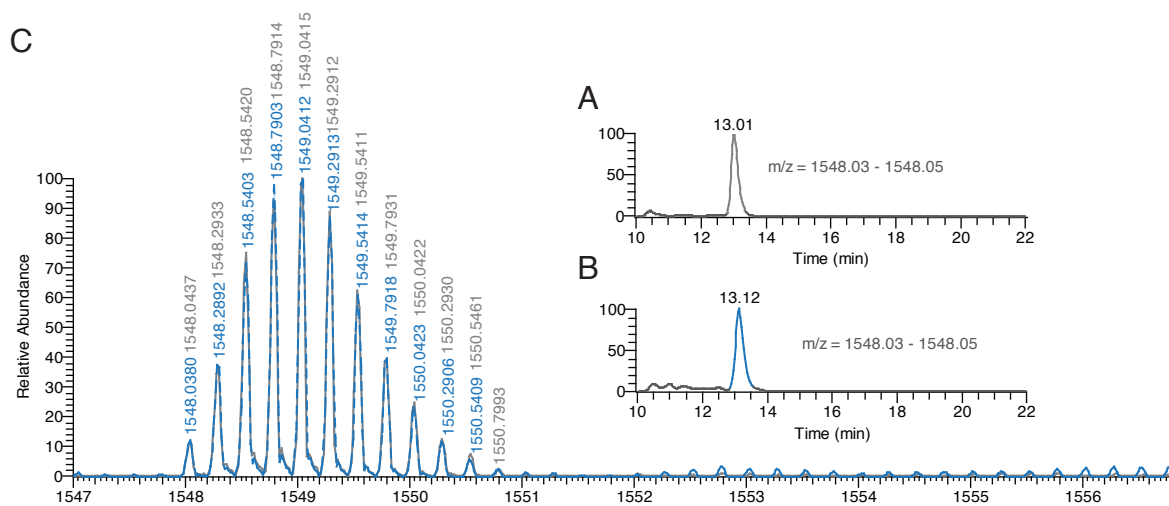


Abbildung 4.41: HPLC-HRMS-Analyse der SerSkfA^{C4M M12C}-Assays mit Iodacetamidzugabe. (A) Das extrahierte Ionenchromatogramm der Kontrolle mit Iodacetamid zeigt einen Peak bei einer Retentionszeit von 13.0 min. (B) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Reaktionsassays mit Iodacetamid. Es ist eine Verbindung mit einer Retentionszeit von 13.1 zu identifizieren. (C) Massenspektren der Verbindungen aus Kontrolle und Assay. Sie sind jeweils farblich den extrahierten Peaks zuzuordnen.

Die Frage, ob die in der Sactipeptidbiosynthese involvierten Radical SAM Enzyme in der Lage sind, die Bildung von Ethern zu katalysieren, wurde für AlbA im Rahmen der *in vivo*-Studien (Kapitel 4.1.16) beantwortet. Für SkfB wurden *in vitro*-Assays mit der SerSkfA^{C4S}-Variante

durchgeführt. In der HPLC-HRMS-Analyse der Kontrolle (Abbildung A.22a) sind trotz Oxidation zwei Peaks mit Retentionszeiten von 12.3 min und 13.8 min zu beobachten. Die Verbindung mit der geringeren Retentionszeit besitzt ein m/z -Verhältnis von $[M+4H]^{4+} = 1500.7810$ und ist damit einfach verbrücktem SerSkfA^{C4S} zuzuordnen ($[M+4H]^{4+} = 1500.7724$). Die Verbindung mit der höheren Retentionszeit besitzt ein m/z -Verhältnis von $[M+4H]^{4+} = 1501.2855$ und ist demnach unverbrücktem SerSkfA^{C4S} zuzuordnen ($[M+4H]^{4+} = 1501.2763$). Im Reaktionsassay ist im extrahierten Ionenchromatogramm nur 1b-SerSkfA^{C4S} bei 12.3 min mit einem m/z -Verhältnis von $[M+4H]^{4+} = 1500.7781$ zu detektieren (Abbildung A.22b). Zur Unterscheidung zwischen Disulfid- und Thioetherbrückenbildung wurden Kontrolle und Reaktionsassay mit Iodacetamid versetzt (Abbildung 4.42). Im Ionenchromatogramm der Kontrolle mit Iodacetamidzugabe wurde ein Peak mit einer Retentionszeit von 13.3 min extrahiert. Die zugehörige Verbindung besitzt ein m/z -Verhältnis von $[M+4H]^{4+} = 1529.7987$. Im mit Iodacetamid versetzten Reaktionsassay ist im extrahierten Ionenchromatogramm ebenfalls eine Verbindung mit einer Retentionszeit von 13.3 min zu identifizieren. Sie besitzt ein ähnliches m/z -Verhältnis von $[M+4H]^{4+} = 1529.7853$. Bei beiden Verbindungen handelt es sich um zweifach carbamidomethyliertes SerSkfA^{C4S}, das über ein berechnetes m/z -Verhältnis von $[M+4H]^{4+} = 1529.7870$ verfügt.

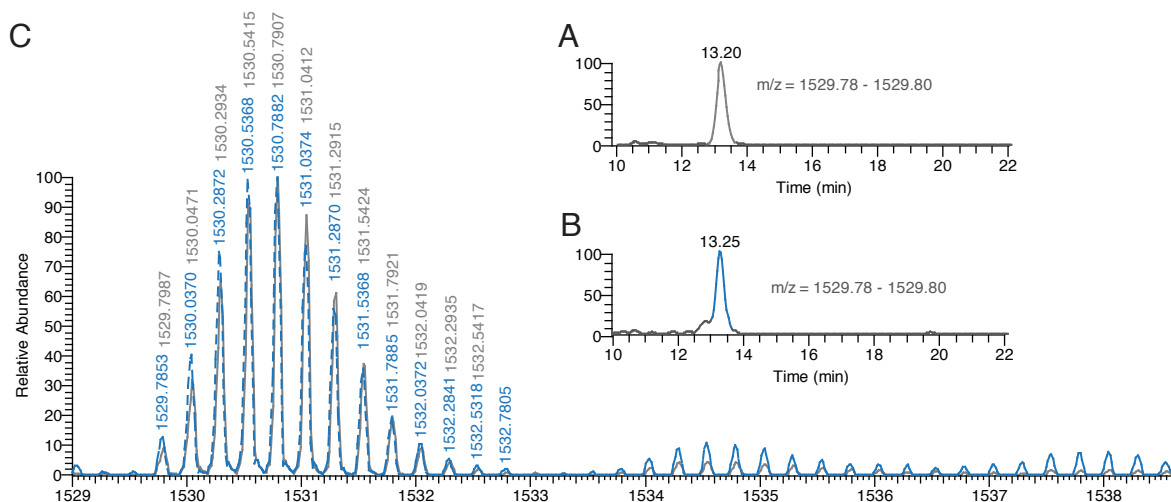


Abbildung 4.42: HPLC-HRMS-Analyse der SerSkfA^{C4S}-Assays mit Iodacetamidzugabe. (A) Das extrahierte Ionenchromatogramm der Kontrolle mit Iodacetamid zeigt einen Peak bei einer Retentionszeit von 13.3 min. (B) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Reaktionsassays mit Iodacetamid. Es ist ebenfalls eine Verbindung mit einer Retentionszeit von 13.3 zu identifizieren. (C) Massenspektren der Verbindungen aus Kontrolle und Assay. Sie sind jeweils farblich den extrahierten Peaks zuzuordnen.

Die restlichen zehn SerSkfA-Mutanten sollten Aufschluss über die Substratspezifität von SkfB bezüglich der Akzeptoraminosäure bringen. Dafür wurden die Varianten SerSkfA^{M12A}, SerSkfA^{M12S}, SerSkfA^{M12T}, SerSkfA^{M12N}, SerSkfA^{M12Y}, SerSkfA^{M12F}, SerSkfA^{M12Q}, SerSkfA^{M12K}, SerSk-

fA^{M12E} und SerSkfA^{M12L} generiert. Die Aminosäuren der ersten sechs Mutanten wurden ausgewählt, da sie als Akzeptor in anderen Sactipeptiden wie Subtilisin A (Kawulka et al., 2003), Thurincin H (Sit et al., 2011b) und Thuricin CD (Rea et al., 2010; Sit et al., 2011a) vorkommen. Die restlichen vier Aminosäuren wurden wegen ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu Methionin ausgewählt. Im Gegensatz zu den bisher durchgeführten Assays wurden für die SerSkfA-Varianten der Akzeptoraminosäure nur je eine Kontrolle und ein Reaktionsassay erbracht. Eine erfolgreiche Modifikation des Vorläuferpeptids durch SkfB wurde durch Nachweis der zweifach verbrückten Spezies im Reaktionsassay nachgewiesen. Wurde nach Oxidation nur einfach verbrücktes SerSkfA^{Variante} gefunden, wird angenommen, dass sie eine Disulfidbindung enthält. In den SerSkfA-Assays konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass sich nach erfolgreicher Thioetherbrückenbildung eine Disulfidbrücke unter den oxidativen Bedingungen der weiteren Aufarbeitung ausbildete und somit ein Massenspektrum, das einer zweifach verbrückten Spezies entspricht, detektiert wurde. Exemplarisch werden im Folgenden die HPLC-HRMS-Analysen der Assays mit SerSkfA^{M12Y} und SerSkfA^{M12E} vorgestellt. Die restlichen HPLC-HRMS-Analysen sind in Abbildung A.23 bis A.30 zusammengefasst. Die Ergebnisse der HPLC-HRMS-Analyse der Assays mit SerSkfA^{M12Y} sind in Abbildung 4.43 gezeigt. Im extrahierten Ionenchromatogramm der Kontrolle ist ein Peak bei einer Retentionszeit von 12.8 min zu identifizieren. Die zugehörige Verbindung besitzt ein m/z-Verhältnis von $[M+4H]^{4+} = 1512.7815$ und entspricht damit der einfach verbrückten SerSkfA^{M12Y}-Variante ($[M+4H]^{4+} = 1512.7724$). Im Ionenchromatogramm des Reaktionsassays ist ein weiterer Peak bei einer Retentionszeit von 14.9 min zu identifizieren. Die zugehörige SerSkfA^{M12Y}-Spezies besitzt ein m/z-Verhältnis von $[M+4H]^{4+} = 1512.2704$. Es handelt sich hierbei um zweifach verbrücktes SerSkfA^{M12Y} ($[M+4H]^{4+} = 1512.2685$).

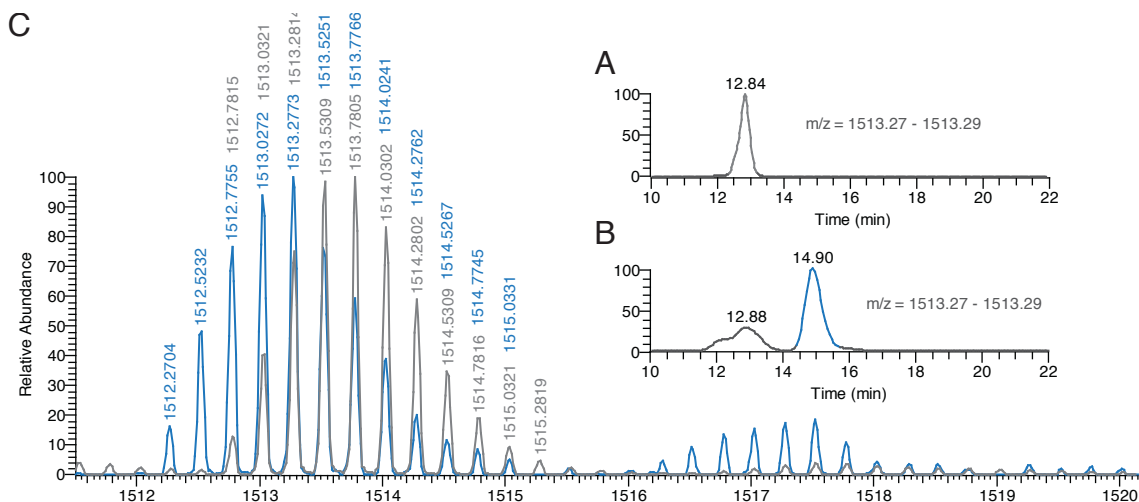


Abbildung 4.43: HPLC-HRMS-Analyse der SerSkfA^{M12Y}-Assays. (A) Das extrahierte Ionenchromatogramm der Kontrolle zeigt einen Peak bei einer Retentionszeit von 12.8 min. (B) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Reaktionsassays. Es ist neben der Verbindung mit einer Retentionszeit von 12.8 min eine neue Verbindung bei 14.9 min zu identifizieren. (C) Massenspektren der Verbindungen aus Kontrolle und Assay. Sie sind jeweils farblich den extrahierten Peaks zuzuordnen.

Zum Vergleich ist das Ergebnis der HPLC-HRMS-Analyse der Assays mit SerSkfA^{M12E} in Abbildung 4.44 gezeigt. Bei dieser Substitution der Akzeptoraminosäure findet keine SkfB-katalysierte Modifikation am Vorläuferpeptid statt. Im extrahierten Ionenchromatogramm der Kontrolle ist eine Verbindung mit einem m/z-Verhältnis von $[M+4H]^{4+} = 1504.2668$ und einer Retentionszeit von 12.3 min zu identifizieren. Dieselbe Verbindung wird auch im Reaktionsassay mit einer Retentionszeit von 12.3 min und einem m/z-Verhältnis von $[M+4H]^{4+} = 1504.2761$ nachgewiesen. Dabei handelt es sich jeweils um einfach verbrücktes SerSkfA^{M12E}, das über ein berechnetes m/z-Verhältnis von $[M+4H]^{4+} = 1504.2672$ verfügt.

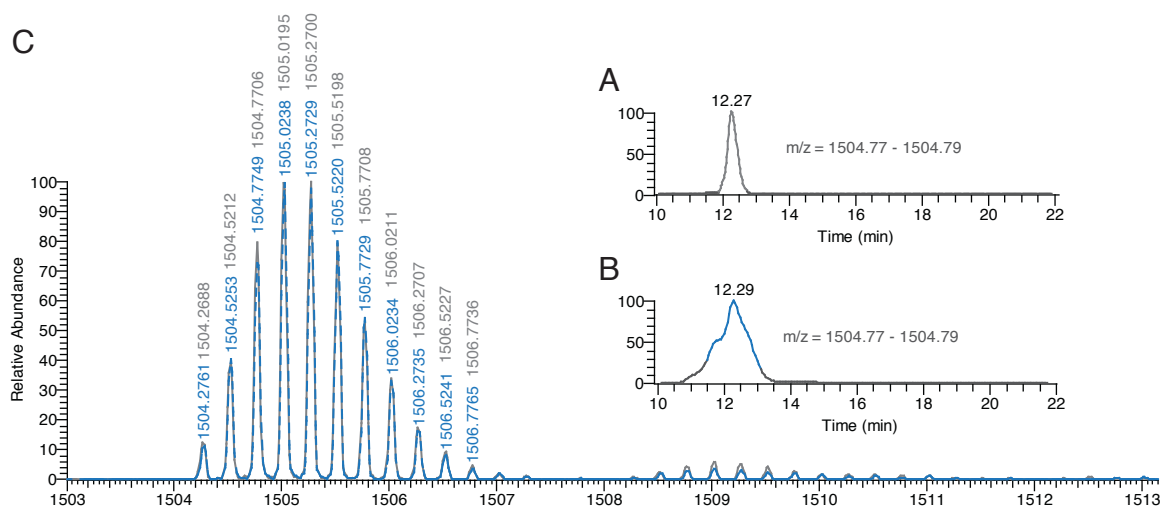


Abbildung 4.44: HPLC-HRMS-Analyse der SerSkfA^{M12E}-Assays. (A) Das extrahierte Ionenchromatogramm der Kontrolle zeigt einen Peak bei einer Retentionszeit von 12.3 min. (B) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Reaktionsassays. Es ist ebenfalls die Verbindung mit einer Retentionszeit von 12.3 min zu identifizieren. (C) Massenspektren der Verbindungen aus Kontrolle und Assay. Sie sind jeweils farblich den extrahierten Peaks zuzuordnen.

Einen Überblick der Ergebnisse aller Assays mit den SerSkfA-Akzeptoraminosäure-Varianten gibt Tabelle 4.6. In sieben der zehn untersuchten Mutanten ist die Bildung einer zweifach verbrückten SerSkfA-Spezies zu beobachten, was auf eine hohe Substrattoleranz hinsichtlich der Akzeptorposition schließen lässt. Drei der SerSkfA-Varianten wurden von SkfB nicht modifiziert. In diesen Mutanten wurde Methionin gegen stark hydrophile Aminosäuren ausgetauscht. Zusätzlich zur Bestimmung der eigentlichen Modifizierung wurden die Umsätze quantifiziert. Dafür wurden die Flächen der extrahierten Ionenchromatogramme der einfach verbrückten und zweifach verbrückten SerSkfA-Varianten verglichen. Es wurde zunächst aus beiden Flächen die Gesamtfläche bestimmt. Der prozentuelle Anteil der Fläche der zweifach verbrückten SerSkfA-Spezies entsprach dann deren Umsatz. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.7 gezeigt. Unter den Reaktionsbedingungen wurden maximal 60% des Vorläuferpeptids modifiziert. Auch lässt sich ein Unterschied in der Modifikationseffizienz der verschiedenen Akzeptor-Varianten erkennen.

Tabelle 4.6: Übersicht über die, in den HPLC-HRMS-Analysen der Assays der SerSkfA-Akzeptoraminosäure-Varianten, detektierten SerSkfA^{Variante}-Spezies. Die m/z-Verhältnisse beziehen sich immer auf die vierfach positiv geladene Verbindung ($[M+4H]^{4+}$). Die berechneten m/z-Verhältnisse der verschiedenen verbrückten Spezies sind jeweils mit angegeben.

SerSkfAVariante	m/z (WT) ¹	r _t (WT) ²	m/z (1b) ³	t _R (1b) ⁴	m/z (2b) ⁵	t _R (1b) ⁶
M12A berechnet	1490.2697	- ⁷	1489.7658	-	1489.2619	-
M12A Kontrolle	-	-	1489.7680	12.2 min	-	-
M12A Assay	-	-	nb ⁸	12.2 min	1489.2712	14.6 min
M12L berechnet	1500.7815	-	1500.2776	-	1499.7737	-
M12L Kontrolle	1500.7876	14.5 min	1500.2855	13.6 min	-	-
M12L Assay	-	-	nb	13.8 min	1499.7818	15.4 min
M12F berechnet	1509.2776	-	1508.7737	-	1508.2697	-
M12F Kontrolle	-	-	1508.7782	13.5 min	-	-
M12F Assay	-	-	nb	13.6 min	1508.2768	15.6 min
M12Y berechnet	1513.2763	-	1512.7724	-	1512.2685	-
M12Y Kontrolle	-	-	1512.7815	12.8 min	-	-
M12Y Assay	-	-	nb	12.9 min	1512.2704	-
M12T berechnet	1497.7724	-	1497.2685	-	1496.7646	-
M12T Kontrolle	-	-	1497.2714	12.0 min	-	-
M12T Assay	-	-	nb	12.2 min	1496.7695	14.5 min
M12S berechnet	1494.2685	-	1493.7646	-	1496.2606	-
M12S Kontrolle	1494.2704	12.7 min	1493.7663	11.8 min	-	-
M12S Assay	nb	12.5 min	nb	11.7 min	1493.2684	14.9 min
M12N berechnet	1501.0185	-	1500.5173	-	1500.0134	-
M12N Kontrolle	-	-	1500.5223	11.9 min	-	-
M12N Assay	-	-	nb	12.1 min	1500.0192	14.5 min
M12E berechnet	1504.7711	-	1504.2672	-	1503.7633	-
M12E Kontrolle	-	-	1504.2688	12.3 min	-	-
M12E Assay	-	-	1504.2761	12.3 min	-	-

ERGEBNISSE

SerSkfAVariante	m/z (WT) ¹	r _t (WT) ²	m/z (1b) ³	t _R (1b) ⁴	m/z (2b) ⁵	t _R (1b) ⁶
M12Q berechnet	1504.2731	-	1503.7692	-	1503.2654	-
M12Q Kontrolle	-	-	1503.7769	13.1 min	-	-
M12Q Assay	-	-	1503.7746	13.3 min	-	-
M12K berechnet	1504.5342	-	1504.0303	-	1503.5264	-
M12K Kontrolle	-	-	1504.0348	11.6 min	-	-
M12K Assay	-	-	1504.0377	12.0 min	-	-

¹m/z-Verhältnis der nicht verbrückten SerSkfA-Variante; ²Retentionszeit der nicht verbrückten SerSkfA-Variante; ³m/z-Verhältnis der einfach verbrückten SerSkfA-Variante; ⁴Retentionszeit der einfach verbrückten SerSkfA-Variante; ⁵m/z-Verhältnis der zweifach verbrückten SerSkfA-Variante; ⁶Retentionszeit der zweifach verbrückten SerSkfA-Variante; ⁷Der Strich zeigt an, dass die jeweilige Eigenschaft bzw. SerSkfA-Spezies nicht berechnet bzw. beobachtet werden konnte; ⁸Das jeweilige m/z-Verhältnis wurde nicht erneut bestimmt. Es ist nur die Retentionszeit angeben.

Tabelle 4.7: Übersicht über die prozentualen Umsätze der untersuchten SerSkfA-Varianten in die jeweils zweifach verbrückte Spezies in 4 h Reaktionszeit. Fand keine von SkfB katalysierte Modifikation statt, betrug der Umsatz 0%.

Variante	Umsatz in 4 h	Variante	Umsatz in 4 h
SerSkfA	56%	SerSkfA ^{C4A}	0%
SerSkfA ^{C4S}	0%	SerSkfA ^{C4M M12C}	0%
SerSkfA ^{M12A}	53%	SerSkfA ^{M12L}	48%
SerSkfA ^{M12F}	51%	SerSkfA ^{M12Y}	63%
SerSkfA ^{M12T}	19%	SerSkfA ^{M12S}	25%
SerSkfA ^{M12N}	26%	SerSkfA ^{M12E}	0%
SerSkfA ^{M12Q}	0%	SerSkfA ^{M12K}	0%

4.2.10 Modifikationsassays mit der leaderpeptidlosen SkfA-Variante

Um die Funktion des Leaderpeptids innerhalb der von SkfB katalysierten Reaktion zu untersuchen, wurden Modifikationsassays mit einer leaderpeptidlosen SkfA-Variante, in der die 29 N-terminalen Aminosäuren entfernt waren, durchgeführt. Es wurden die in Kapitel 4.2.8 beschriebenen Assays durchgeführt und anschließend mittels HPLC-HRMS analysiert (Abbildungen 4.45 & A.31). Nach Probenaufbereitung unter oxidativen Bedingungen war in der Kontrolle eine lISkfA-Spezies mit einem m/z-Verhältnis von $[M+2H]^{2+} = 1401.6725$ zu identifizieren. Sie ist damit einfach verbrücktem lISkfA mit einem m/z-Verhältnis von $[M+2H]^{2+} = 1401.6699$ zuzuordnen.

Wird die Verbindung mit Iodacetamid versetzt, bildet sich ein Derivat mit einem m/z -Verhältnis von $[M+2H]^{2+} = 1488.2126$, das dreifach carbamidomethyliertem IISkfA ($[M+2H]^{2+} = 1488.2099$) zuzuordnen ist. Im Reaktionsassay ist, wie in der Kontrolle eine, einfach verbrückte IISkfA-Spezies mit einem m/z -Verhältnis von $[M+2H]^{2+} = 1401.6732$ zu identifizieren. Dieses IISkfA-Derivat lässt durch Iodacetamid ebenfalls dreimal carbamidomethylieren. Nach Iodacetamidzugabe wird im Reaktionsassay ausschließlich eine Verbindung mit einem m/z -Verhältnis von $[M+2H]^{2+} = 1488.2138$ detektiert. Die Retentionszeiten der in Kontrolle und Assay identifizierten Verbindungen sind ebenfalls identisch.

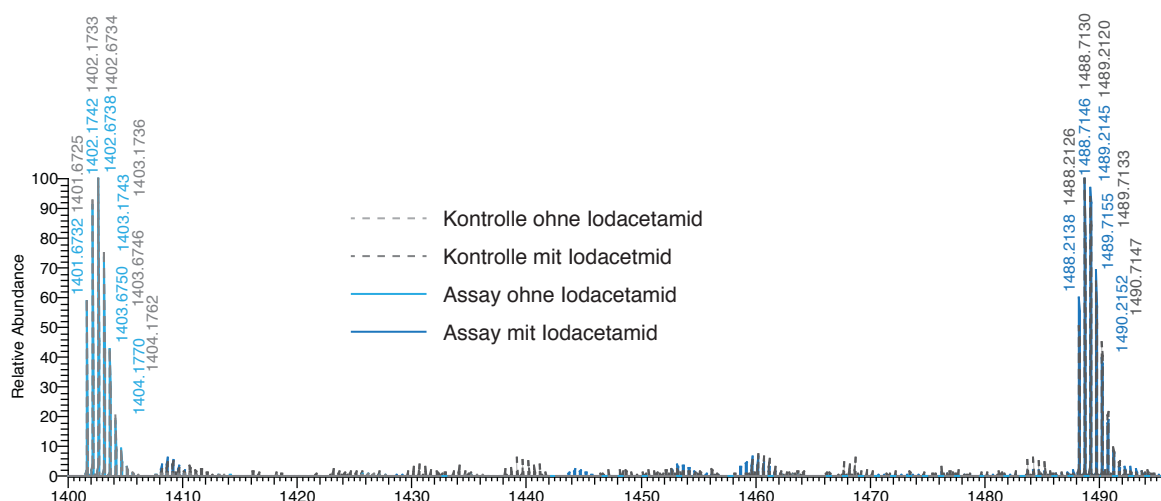


Abbildung 4.45: Massenspektren der HPLC-HRMS-Analysen der verschiedenen Vorläuferpeptidmodifikationsassays mit IISkfA. Gezeigt sind jeweils die Massenspektren der in Abbildung A.31 extrahierten Peaks.

4.2.11 Identifikation der zweiten [4Fe-4S]-Clusterbindungsstelle in SkfB

In den Kapiteln 4.2.3 und 4.2.5 wurde gezeigt, dass SkfB einen zweiten [4Fe-4S]-Cluster bindet. Zur Bestimmung der Koordinationsstelle des zweiten Clusters wurde, wie schon für AlbA, ein Alignment mit weiteren putativen Radical SAM Enzymen, die in Sactipeptid-produzierenden Genclustern vorkommen durchgeführt (Abbildungen 4.21 und A.11). In der Aminosäuresequenz von SkfB sind wie bei AlbA drei Cysteinreste im C-terminalen Bereich konserviert. Da für AlbA gezeigt wurde, dass diese Cysteine den zweiten [4Fe-4S]-Cluster koordinieren, wurde auch für SkfB zunächst davon ausgegangen, dass diese Aminosäuren den zweiten Fe/S-Cluster koordinieren. Bei SkfB handelt es sich um die Cysteine Cys380 Cys385 und Cys387. Daher wurde mittels der SLIM-Methode die SkfB^{C380A C385 C387A}-Variante generiert. Nach erfolgreicher Reinigung per Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie und Rekonstitution wurden 20 mg Protein pro Liter Expressionkultur erhalten. Anschließend wurde der Eisengehalt der SkfB-Mutante bestimmt.

Dafür wurde auf die in Kapitel 4.1.3 bestimmte Eichgerade zurückgegriffen, um aus den bestimmten Optischen Dichten bei 593 nm des Fe-Ferene Komplexes die Eisenmenge zu bestimmen. Ein Überblick über die bestimmten Daten gibt Tabelle 4.8. Daraus ergibt sich ein durchschnittlicher Eisengehalt von 4.20 ± 0.11 Äquivalenten pro Äquivalent SkfB^{C380A C385A C387A}. Der Eisengehalt hat sich im Vergleich zum Wild-Typ-Protein um vier Äquivalente reduziert, was auf die Entfernung des zweiten [4Fe-4S]-Cluster schließen lässt. Um diese Annahme zu bestätigen, wurde die SkfB-Mutante spektroskopisch charakterisiert und auf SAM-Spaltungsaktivität hin untersucht.

Tabelle 4.8: Messdaten der Eisenbestimmung der SkfB^{C380A C385A C387A}-Variante.

n (SkfB ^{C380A C385A C387A})	OD ₅₉₃	n (Fe ³⁺)	Verhältnis SkfB ^{C380A C385A C387A} .Fe ³⁺
1.48 nmol	0.199	5.94 nmol	1 : 4.01
2.22 nmol	0.319	9.52 nmol	1 : 4.29
2.96 nmol	0.410	12.2 nmol	1 : 4.14
2.96 nmol	0.429	12.8 nmol	1 : 4.33
3.70 nmol	0.533	15.9 nmol	1 : 4.21

Die Ergebnisse der spektroskopischen Charakterisierung der SkfB^{C380A C385A C387A}-Variante sind in Abbildung 4.46 zusammengefasst. Das UV-Vis-Spektrum (Abbildung 4.46a) des nicht oxidierten Enzyms zeigt die für [4Fe-4S]-Cluster-enthaltenen Proteine typischen Absorptionsbanden bei 325 nm und 410 nm. Die reduzierte Form der SkfB-Mutante besitzt keine charakteristischen Absorptionsbanden. Im Gegensatz dazu ist die Spezies EPR-aktiv (Abbildung 4.46b). Es sind die für [4Fe-4S]⁺-Cluster charakteristischen EPR-Signale bei $g = 2.03$ und $g = 1.93$ zu detektieren. Die nicht reduzierte Form der SkfB-Variante sollte mit einem gebundenen [4Fe-4S]²⁺-Cluster EPR inaktiv sein. Es ist trotzdem ein EPR-Signal bei $g = 2.01$ zu beobachten. Das deutet auf die Anwesenheit von [3Fe-4S]⁺-Clustern hin, die sich durch Degradation aus [4Fe-4S]-Clustern bilden können (Duschene and Broderick, 2010). Um die Beschaffenheit des in SkfB^{C380A C385A C387A} enthaltenen Fe/S-Clusters exakt bestimmen zu können, wurden zusätzlich temperaturabhängige EPR-Messungen durchgeführt (Abbildung 4.46c). Die maximale Signalintensität des EPR-Signals bei $g = 1.93$ ist bei einer Temperatur von ungefähr 20 K zu beobachten. Diese Temperatur ist für einen [4Fe-4S]-Cluster charakteristisch. Die rekonstituierte SkfB^{C380A C385A C387A}-Variante bindet daher einen [4Fe-4S]-Cluster. Dass es sich dabei um den, vom CXXXCXXC-Motiv koordinierten Fe/S-Cluster handelt, wurde durch Bestimmung der SAM-Spaltungsaktivität der SkfB-Mutante nachgewiesen (Abbildung 4.47).

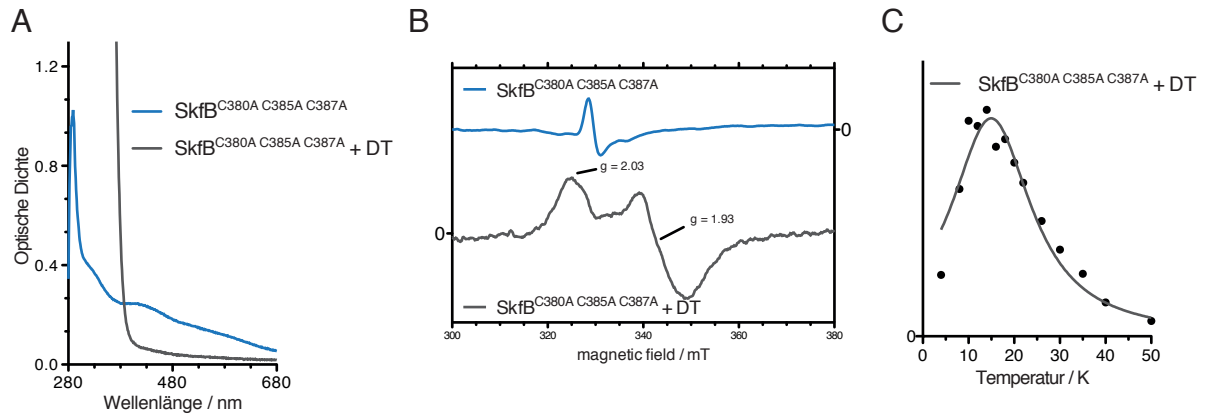


Abbildung 4.46: Charakterisierung der SkfB^{C380A C385A C387A}-Mutante mittels UV-Vis- und EPR-Spektroskopie. (A) Das UV-Vis-Spektrum der nicht reduzierten SkfB-Variante (blau) zeigt die für [4Fe-4S]-Cluster charakteristischen Absorptionsbanden bei 325 nm und 410 nm. Die reduzierte Form (grau) zeigt keine spezifischen Absorptionsbanden. (B) Das EPR-Spektrum der nicht reduzierten AlbA-Variante zeigt ein geringes EPR-Signal bei $g = 2.01$. Im Gegensatz dazu verfügt die mit Natriumdithionit reduzierte AlbA-Mutante über EPR-Signale bei $g = 2.03$ und $g = 1.92$. (C) Die temperaturabhängigen EPR-Messungen zeigen eine maximale Signalintensität bei ungefähr 20 K.

Für die SkfB^{C380A C385A C387A}-Mutante wurden drei SAM-Spaltungsaktivitätsassays durchgeführt: 1.) eine Kontrolle ohne SkfB^{C380A C385A C387A}, aber mit SAM und DT (I), 2.) eine Kontrolle ohne DT, aber mit SAM und SkfB^{C380A C385A C387A} (II) und 3.) einen vollständigen Assay mit SAM, DT und SkfB^{C380A C385A C387A} (III). Nur im Reaktionsassay sind große Mengen an Met und 5'-dA zu detektieren. Die SkfB-Variante ist weiterhin in der Lage, SAM reduktiv zu spalten. Der durch das CXXXCXXC-Motiv gebundene [4Fe-4S]-Cluster ist weiterhin intakt. Da die Mutante nur einen [4Fe-4S]-Cluster bindet, muss der zweite Fe/S-Cluster über die Cysteine Cys380 Cys385 und Cys387 koordiniert werden.

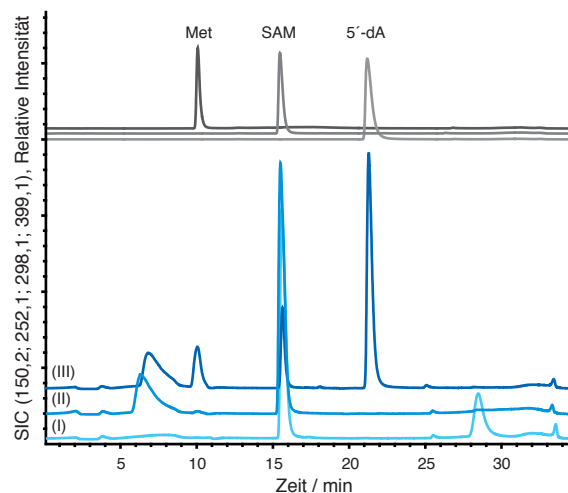


Abbildung 4.47: Single-Ion-Chromatogramme (SICs) der SAM-Spaltungsaktivitätsassays mit SkfB^{C380A C385A C387A}. Die grauen Chromatogramme entsprechen Standards von Met, SAM und 5'-dA. Die blauen Chromatogramme zeigen die HPLC-MS-Analysen der verschiedenen Assayzusammensetzungen. (I) entspricht der Kontrolle ohne SkfB-Variante mit SAM und DT, (II) entspricht der Kontrolle mit SkfB-Variante und SAM aber ohne DT und (III) entspricht dem Assay mit SAM, SkfB Mutante und DT.

Um den Einfluss des zweiten [4Fe-4S]-Clusters auf die Synthese des Thioethers in SkfA zu untersuchen, wurde ein Vorläuferpeptidmodifikationsassay mit SkfB^{C380A C385A C387A} und SerSkfA durchgeführt (Abbildung 4.48). Im extrahierten Ionenchromatogramm der Kontrolle ist nach Oxidation, wie zu erwarten, die einfach verbrückte SerSkfA-Spezies mit einem m/z-Verhältnis von $[M+4H]^{4+} = 1504.7775$ und einer Retentionszeit von 12.8 min zu detektieren. Dieselbe Verbindung ($t_R = 12.9$ min) mit einem m/z-Verhältnis von $[M+4H]^{4+} = 1504.7643$ wird ebenfalls nach oxidativer Aufarbeitung des Reaktionsassays gefunden. Die SkfB-Mutante ist daher nicht in der Lage, die Thioetherbrückenbildung in SerSkfA zu katalysieren. Dies stimmt mit den in Kapitel 4.1.14 erzielten Ergebnissen für die AlbA^{C408A C414A C417A}-Variante überein.

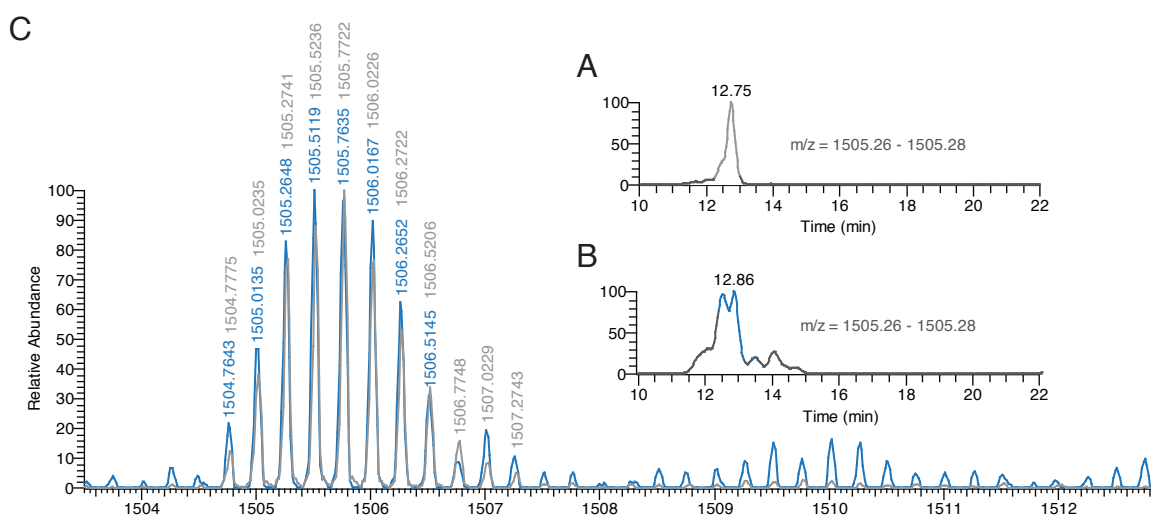


Abbildung 4.48: HPLC-HRMS-Analyse des Assays und der Kontrolle mit SerSkfA und der SkfB^{C380A C385A C387A}-Mutante. (A) Extrahiertes Ionenchromatogramm der Kontrolle. Die extrahierte Masse ist mit angegeben. Es wurde ein Peak mit einer Retentionszeit von 12.8 min identifiziert. (B) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Reaktionsassays. Es wird eine Verbindung mit einer Retentionszeit von 12.9 min detektiert. (C) Massenspektrum der in der Kontrolle und Reaktionsassay detektierten Verbindungen. Die Spektren sind farblich den extrahierten Peaks zuzuordnen.

4.2.12 Kristallisation von SkfB

Die Struktur von SkfB sollte mittels Kristallstrukturanalyse aufgeklärt werden. Dazu mussten zunächst SkfB-Kristalle mit einer Auflösung von unter 3 Å gezüchtet werden. Die Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Gunhild Layer (TU Braunschweig) durchgeführt. Radical SAM Enzyme sind unter aeroben Bedingungen sehr instabil. Die Kristallisation wurde daher unter anaeroben Bedingungen mit ebenfalls vollständig anaerob gereinigtem SkfB durchgeführt. Zur Bestimmung guter Kristallisationsbedingungen wurde im ersten Schritt ein Screening mit insgesamt acht Suiten des NeXtal Kristallisationsprogramms (Qiagen) ausprobiert. SkfB kristallisierte dabei in drei der 768 getesteten Bedingungen. Die am besten geformten Kristalle waren in Bedingung 65 der JCSG Core I Suite zu finden (Abbildung 4.49a). Um die Qualität der Kristalle

bestimmen zu können, wurden sie teilweise am Synchrotron vermessen. Bei einem Kristall konnte eine Auflösung von 2.8 Å festgestellt werden. Leider ist es nicht gelungen, das anomale Eisensignal zu detektieren, so dass eine Strukturbestimmung nicht möglich war. Für weitere Kristallisationsversuche wurde ein Feinscreening der Bedingung 65 durchgeführt. Es wurden ebenfalls Kristalle erhalten (Abbildung 4.49b). Diese haben eine Auflösung von nur 4.0 Å erreicht.

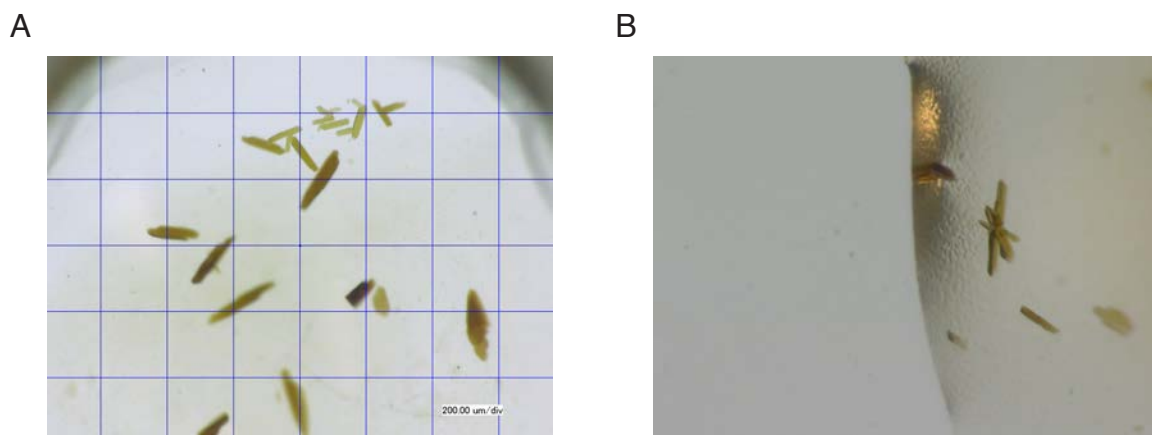


Abbildung 4.49: Aufnahmen von SkfB Kristallen. (A) Kristalle, die in Bedingung 65 der JCSG Core I Suite gezüchtet wurden. Sie besaßen eine Auflösung bis 2.8 Å. (B) SkfB Kristalle, die im Feinscreening der Bedingung erhalten wurden. Ihre Auflösung betrug bis zu 4.0 Å.

4.3 Genomic Mining nach putativen Sactipeptiden

4.3.1 *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* BRL-230010

Durch eine Blast-Analyse (blastp, NCBI) mit der Aminosäuresequenz des Vorläuferpeptids des Sporulation Killing Factors (SkfA) wurde ein zum *skf*-Operon homologer Gencluster in *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* BRL-230010 identifiziert (Abbildung 4.50a). Er setzt sich aus sieben Genen zusammen, dessen Genprodukte alle eine hohe Homologie zu den in der Biosynthese von SKF enthaltenen Proteinen besitzen (Tabelle 4.9). Ein Alignment der Aminosäuresequenz des putativen Vorläuferpeptids Plarl_01010008160 und SkfA ist in Abbildung 4.50b gezeigt. Plarl_01010008160 ist mit einer Länge von 61 Aminosäuren um sechs Aminosäuren länger als SkfA. Das Alignment zeigt, dass jeweils 22 Aminosäuren in beiden Peptiden konserviert sind. Dazu zählen alle Cysteinreste. Interessant ist auch der Grad der Konservierung im Leaderpeptid. So ist in beiden Peptiden ein Glycin an Position -1, ein Lysin an Position -4, ein Glycin an Position -9, eine KP-Sequenz an den Positionen -11 und -12 und sieben weitere Aminosäuren enthalten. Der Abstand der konservierten Bereiche beträgt untereinander ungefähr 4 bzw. 7 Aminosäuren. Für einige Vorläuferpeptide von ribosomalen Sekundärmetaboliten ist bekannt,

dass ihre Leaderpeptidsequenzen eine α -Helikale Struktur ausbilden (Oman and van der Donk, 2009). Die in SkfA und Plarl_010100008160 konservierten Aminosäuren im Bereich des Leaderpeptids würden auf einer Seite solch einer Helix liegen und könnten damit für die Erkennung des Vorläuferpeptids durch die prozessierenden Enzyme in Frage kommen. Im Corepeptid sind ebenfalls Aminosäuren mit einem Abstand von ungefähr 4 Positionen konserviert.

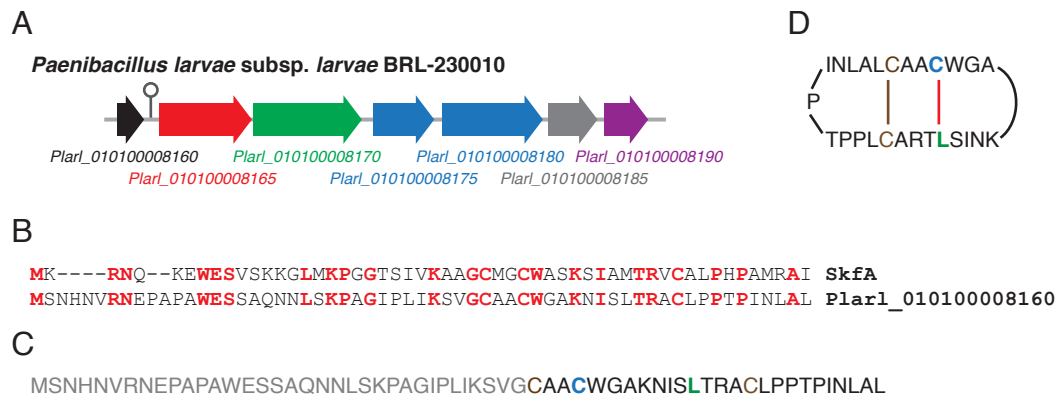


Abbildung 4.50: Schematischer Überblick über den durch eine Blast-Analyse mit SkfA identifizierten Gencluster in *Paenibacillus larvae subsp. larvae* BRL-230010. (A) Schematische Übersicht über die identifizierten Gene. Der Gencluster besitzt den gleichen Aufbau wie das *skf*-Operon. Der Farbcode ist Abbildung 1.9 zu entnehmen. (B) Alignment des putativen Vorläuferpeptids Plarl_010100008160 mit SkfA. (C) Voraussichtliche Einteilung des Vorläuferpeptids in Leaderpeptid (grau) und Corepeptid (schwarz). Die beiden Cysteinreste, die aller Voraussicht nach eine Disulfidbrücke ausbilden, sind braun hervorgehoben. Die Aminosäuren, die den Thioether aufbauen, sind in blau und grün gezeigt. (D) Voraussichtliche Struktur des neu identifizierten Sactipeptids, basierend auf dem Alignment aus (B).

Durch das Alignment mit SkfA konnte eine mögliche Einteilung von Plarl_010100008160 in Leader- und Core Peptid durchgeführt werden (Abbildung 4.50c). Alle im Alignment beobachteten Lücken liegen im Bereich des Leaderpeptids. Daher ist davon auszugehen, dass das Leaderpeptid bei dem Sactipeptid aus *P. larvae* um sechs Aminosäuren länger ist als das von SKF. Da damit die beiden Corepeptide über eine identische Länge verfügen und auch die Positionen der Cysteinreste konserviert sind, ist davon auszugehen, dass Cys1 mit Cys16 ebenfalls eine Disulfidbrücke ausbildet. Cys4 könnte, wie in SKF, mit der Aminosäure an Position 12 (Leu12) eine Thioetherbrücke ausbilden. Die Schnittstelle des Leaderpeptids wäre identisch mit der in SkfA, so dass nach Prozessierung des Vorläuferpeptids durch das putative Radical SAM Enzym Plarl_010100008165 und der putativen Protease Plarl_010100008170 das in Abbildung 4.50d gezeigte Sactipeptid gebildet werden könnte.

Im Zuge dieser Arbeit wurde die DNA eines verwandten *P. larvae* Stammes von DSMZ erworben, da das Arbeiten mit dem oben beschriebenen Stamm auf Grund von Pathogenität gegen Bienen in den zur Verfügung stehenden Laboratorien nicht erlaubt war. Ziel war es, den Gencluster aus *P. larvae* in die *amy*-site von *B. subtilis* 168 mit Hilfe des pX-Vektors zu klonieren.

Der resultierende *B. subtilis*-Stamm wäre dann voraussichtlich in der Lage, das neuartige Sactipeptid durch Zugabe von Amylose zu produzieren. Leider konnte der Gencluster nicht aus der zur Verfügung stehenden DNA mittels PCR amplifiziert werden.

Tabelle 4.9: Übersicht über die putativen Proteine des Sactipeptid-produzierenden Genclusters aus *P. larvae subsp. larvae* BRL-230010. Jedes der vorkommenden Proteine besitzt im skf-Operon ein Homolog (Spalte SKF Homolog).

Protein	Proteinfamilie und Funktion	SKF Homolog
Plarl_010100008160	Vorläuferpeptid	SkfA
Plarl_010100008165	Radical SAM Enzym Generierung von Thioethern	SkfB
Plarl_010100008170	membranständige Protease Abspaltung des Leaderpeptids; Zyklisierung des Peptidrückgrats	SkfC
Plarl_010100008175	ABC-Transporter, ATP-Bindungsprotein Export des Sactipeptids	SkfE
Plarl_010100008180	ABC-Transporter, Permease Export des Sactipeptids	SkfF
Plarl_010100008185	unbekannt	SkfG
Plarl_010100008190	Thioredoxin Katalyse oder Verhinderung der Disulfidbrückenbildung	SkfH

4.3.2 *Dictyoglomus thermophilum* H-6-12

Durch eine Blast-Analyse (blastp, NCBI) mit der Aminosäuresequenz des in der Biosynthese von Subtilosin A beteiligten Radical SAM Enzyms AlbA konnten weitere Gencluster identifiziert werden, die voraussichtlich für die Synthese von Sactipeptiden verantwortlich sind. Einer dieser Gencluster wurde in *Dictyoglomus thermophilum* H-6-12, einem bei Temperaturen von 50 °C bis 80 °C anaerob wachsenden Bakterium, gefunden (Abbildung 4.51a). Der Gencluster besteht aus zwei vorläuferpeptidcodierenden Genen (*DICTH_0223*, *DICTH_0219*). Downstream davon befinden sich jeweils Gene, die für AlbA homologe Radical SAM Enzyme codieren. Der Gencluster verfügt darüber hinaus noch über Gene putativer ABC-Transporter, weiterer Membranproteine, eines weiteren Radical SAM Enzyms und eines Proteins unbekannter Funktion. Eine genaue Übersicht über die Genprodukte liefert Tabelle 4.10. In Abbildung 4.51b ist ein Align-

ment des Vorläuferpeptids DICTH_0223 mit SboA gezeigt. 14 der 44 (DICTH_0223) bzw. 43 (SboA) Aminosäuren sind konserviert. Interessant ist, dass der Abstand der konservierten Aminosäuren, wie bei SkfA und PlarI_010100008160, ungefähr 4 bzw. 7 Positionen entspricht. Sie könnten sich daher ebenfalls auf einer Seite einer α -Helix befinden. Aus dem Alignment konnte ein putativer Leaderpeptidbereich, wie auch der voraussichtliche Ort der Thioetherbrücken vorhergesagt werden (Abbildung 4.51c).

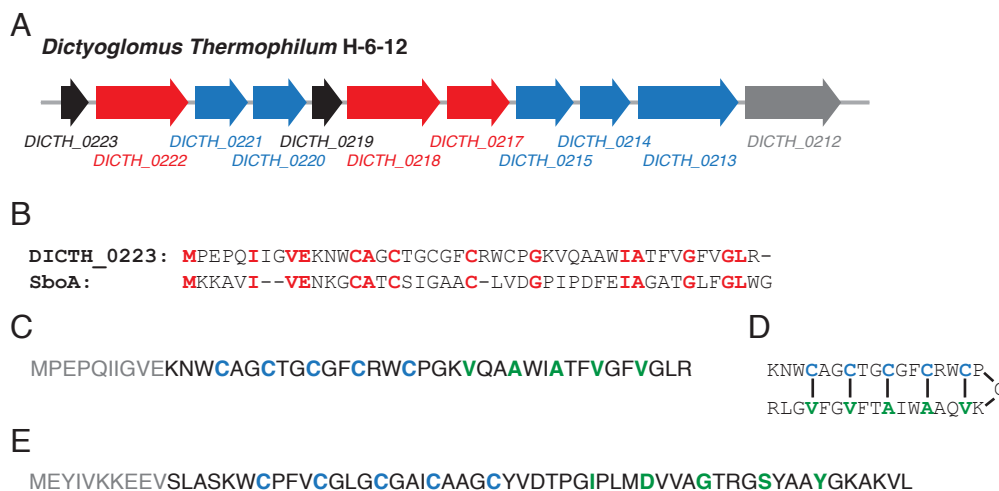


Abbildung 4.51: Überblick über den in *Dictyoglomus thermophilum* H-6-12 identifizierten Gencluster und die Sequenzen der putativen Vorläuferpeptide. (A) Schematischer Überblick über den durch genomisches Mining mit Alba identifizierten Gencluster. Ein interessantes Feature ist, dass der Cluster über zwei Vorläuferpeptide verfügt, denen jeweils ein Gen für ein Radical SAM Enzym folgt. Der Farbcode der Gene ist Abbildung 1.9 zu entnehmen. (B) Alignment der beiden Sactipeptid Vorläuferpeptide SboA und DICTH_0223. Es sind insgesamt 14 Aminosäuren konserviert. Der Abstand der konservierten Reste beträgt zwischen 4 und 7 Aminosäuren. (C) Aus dem Alignment aus (B) erstellte Annotation des Vorläuferpeptids DICTH_0223. Das putative Leaderpeptid ist in grau dargestellt. Das Corepeptid verfügt über fünf Cysteinreste, die jeweils einen Abstand von drei Aminosäuren besitzen und in der Lage sein sollten, Thioetherbrücken mit den grün markierten Aminosäuren auszubilden. (D) Voraussichtliche Struktur des Sactipeptids aus DICTH_0223. Da keine Protease im Gencluster vorkommt wurde angenommen, dass das Radical SAM Enzym DICTH_0217 für die Abspaltung des Leaderpeptids verantwortlich ist. (E) Sequenz des Vorläuferpeptids DICTH_0219. Die Annotation basiert auf der von DICTH_0223. Das Peptid verfügt ebenfalls über fünf Cysteinreste, die aber im Gegensatz zu DICTH_0223 einen Abstand von jeweils vier Aminosäuren besitzen.

DICTH_0223 besitzt fünf Cysteinreste mit einem Abstand von je drei Aminosäuren. Es müsste daher zur Bildung von fünf Thioetherbrücken kommen. Die vorhergesagten Akzeptoraminosäuren besitzen alle hydrophoben Charakter. Da im Gencluster kein Proteasegen vorkommt, wurde angenommen, dass das putative Radical SAM Enzym DICTH_0217 für die Leaderpeptidspaltung verantwortlich ist (Abbildung 4.51d). Die Aminosäuresequenz des zweiten Vorläuferpeptids DICTH_0219 ist in Abbildung 4.51e gezeigt. Es ist mit einer Länge von 62 Aminosäuren deutlich länger als DICTH_0223, besitzt aber ebenfalls fünf Cysteinreste, die sich in einem Abstand von 4 Positionen befinden. Ein Alignment, um einen Strukturvorschlag zu generieren war, nicht

möglich. Mögliche Akzeptoraminosäuren der Thioetherbrücke und der Bereich des Leaderpeptids sind in der Sequenz hervorgehoben.

Tabelle 4.10: Übersicht über die putativen Proteine des in *Dictyoglomus thermophilum* H-6-12 identifizierten Genclusters. Es ist jeweils die Länge, die Proteinfamilie und die putative Funktion jedes gefundenen Proteins aufgelistet.

Protein	Proteinfamilie	Funktion	Länge
DICTH_0223	Vorläuferpeptid	Sekundärmetabolit	45 aa
DICTH_0222	Radical SAM Enzym	Generierung von Thioethern	465 aa
DICTH_0221	ABC-Transporter, ATP-Bindungsprotein	Export	233 aa
DICTH_0220	Membran Protein	Immunität / Export	230 aa
DICTH_0219	Vorläuferpeptid	Sekundärmetabolit	62 aa
DICTH_0218	Radical SAM Enzym	Generierung von Thioethern	470 aa
DICTH_0217	Radical SAM Enzym	Leaderpeptidspaltung	367 aa
DICTH_0215	ABC-Transporter, ATP-Bindungsprotein	Export	309 aa
DICTH_0214	Membranprotein	Immunität / Export	250 aa
DICTH_0213	ABC-Transporter, Permease	Export	569 aa
DICTH_0212	unbekannt	unbekannt	507 aa

4.3.3 *Thermoanaerobacter italicus* Ab9

Ein weiterer Gencluster, der möglicherweise für die Synthese eines Sactipeptids verantwortlich ist, wurde in *Thermoanaerobacter italicus* Ab9, einem in heißen Quellen bei Temperaturen von 45 °C bis 78 °C anaerob wachsenden Bakterium, identifiziert (Abbildung 4.52a). Der gefundene Gencluster ist sehr klein und besteht nur aus vier Genen. Das Gen *Thit_0387* codiert ein Regulatorprotein. Darauf folgen die Gene des Vorläuferpeptids (*Thit_0388*), eines Radical SAM Enzyms (*Thit_0389*) und eines Membranproteins (*Thit_0390*). Eine Auflistung der putativen Proteine liefert Tabelle 4.11. Die Sequenz des putativen Vorläuferpeptids ist in Abbildung 4.52b gezeigt. Das Peptid besitzt einen Cysteinrest, zeigt aber keine weitere Übereinstimmung mit bekannten Sactipeptid Vorläuferpeptiden. Daher können an dieser Stelle keine Rückschlüsse auf die voraussichtliche Struktur gemacht werden.



Abbildung 4.52: Übersicht über den in *Thermoanaerobacter italicus* Ab9 gefundenen Gencluster. (A) Schematischer Aufbau des durch genomisches Mining identifizierten Gencluster. Er besteht aus nur vier Genen. Der Farbcode ist Abbildung 1.10 zu entnehmen. (B) Sequenz des putativen Vorläuferpeptids Thit_0388. Da das Peptid keine Übereinstimmung mit bekannten Sactipeptid Vorläuferpeptiden besitzt, ist eine Annotation in Leader- und Corepeptid nicht möglich. Der Cysteinrest ist farblich hervorgehoben.

Tabelle 4.11: Übersicht über die putativen Proteine des in *Thermoanaerobacter italicus* Ab9 identifizierten Gencluster. Es ist jeweils die Länge, die Proteinfamilie und die putative Funktion jedes gefundenen Proteins aufgelistet.

Protein	Proteinfamilie	Funktion	Länge
Thit_0387	LuxR-Proteinfamilie	Regulator	260 aa
Thit_0388	Vorläuferpeptid	Sekundärmetabolit	67 aa
Thit_0389	Radical SAM Enzym	Generierung des Thioethers	505 aa
Thit_0390	Membranprotein	Immunität / Export	399 aa

4.3.4 *Ruminococcus obeum* ATCC 29174

Ein dritter Gencluster, der für die Synthese eines Sactipeptids in Frage kommt, wurde in *Ruminococcus obeum* ATCC 29174, einem in Tierpansen anaerob wachsenden Gram-positiven Bakterium, identifiziert (Abbildung 4.53a). Der Gencluster besteht aus fünf Genen: ein Gen für ein Vorläuferpeptid (*RUMOBE_02270*), ein Gen für ein Radical SAM Enzym (*RUMOBE_02271*), ein Gen für eine putative Zn-Protease (*RUMOBE_02272*), ein Gen für einen ABC-Transporter (*RUMOBE_02274*) und ein Gen für ein unbekanntes Protein (*RUMOBE_02273*). Einen detaillierten Überblick über die Genprodukte liefert Tabelle 4.12.

Abbildung 4.52b zeigt ein Alignment des putativen Vorläuferpeptids RUMOBE_02270 mit dem Subtilosin A Vorläuferpeptid SboA. Einige Aminosäuren sind konserviert. Interessant ist erneut der Abstand der konservierten Aminosäuren untereinander, der von 3 bis 5 Positionen variiert. Durch das Alignment war es möglich, das Vorläuferpeptid in Leader- und Corepeptid zu unterteilen (Abbildung 4.52c). Zusätzlich war es möglich, die voraussichtlichen Donor- und Akzeptorpositionen der Thioetherbrücken vorherzusagen. Auf Grund dieser Daten konnte die in Abbildung 4.52d gezeigte Struktur erstellt werden. Da der Gencluster nur über eine Zn-abhängige

Protease verfügt, wird davon ausgegangen, dass das Sactipeptid über kein zyklisiertes Peptidrückgrat verfügt.

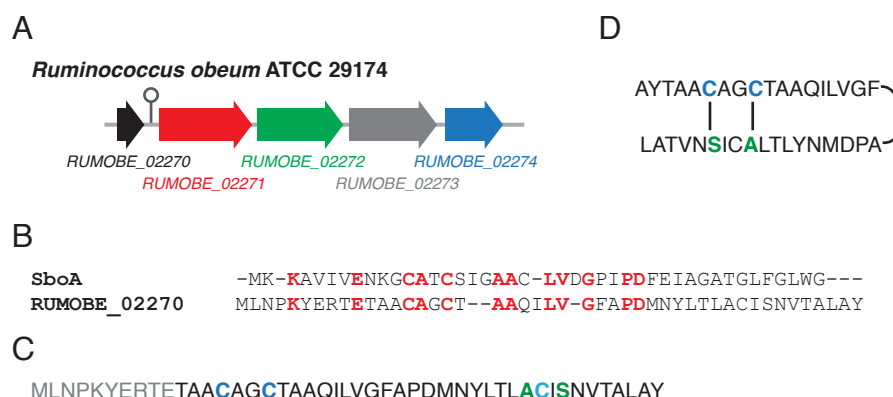


Abbildung 4.53: Übersicht über den in *Ruminococcus obeum* ATCC 29174 identifizierten Gencluster, der aller Voraussicht nach für die Synthese eines Sactipeptids verantwortlich ist. (A) Schematischer Aufbau des durch genomisches Mining mit AlbA gefundenen Genclusters. Zusätzlich zu den Genen, die ein Vorläuferpeptid und ein Radical SAM Enzym codieren, finden sich Gene für eine Zn-abhängige Protease, ein ABC-Transporterprotein und ein Protein unbekannter Funktion. Der Farbcode ist Abbildung 1.9 zu entnehmen. (B) Alignment des putativen Vorläuferpeptids RUMOB_02270 mit SboA. Es sind insgesamt 12 Aminosäuren konserviert. (C) Auf Grundlage des Alignments aus (B) annotierte Sequenz des Vorläuferpeptids RUMOB_02270. Der voraussichtliche Leaderpeptidbereich ist grau gekennzeichnet. Es sind drei Cysteine vorhanden, von denen zwei in SboA konserviert sind. Diese sind in der Sequenz hervorgehoben (blau). Mögliche Akzeptoraminosäuren sind grün markiert. (D) Voraussichtliche Struktur des Sactipeptids. Da nur eine Zn-abhängige Protease im Gencluster vorhanden ist, wird davon ausgegangen, dass der Sekundärmetabolit über ein offenes Peptidrückgrat verfügt.

Tabelle 4.12: Übersicht über die putativen Proteine des in *Ruminococcus obeum* ATCC 29174 identifizierten Genclusters. Es ist jeweils die Länge, die Proteinfamilie und die putative Funktion jedes gefundenen Proteins aufgelistet.

Protein	Proteinfamilie	Funktion	Länge
RUMOB_02270	Vorläuferpeptid	Sekundärmetabolit	46 aa
RUMOB_02271	Radical SAM Enzym	Generierung von Thioethern	480 aa
RUMOB_02272	Zn-abhängige Protease	Abspaltung des Leaderpeptids	406 aa
RUMOB_02273	unbekannt	unbekannt	413 aa
RUMOB_02274	ABC-Transporter, ATP-Bindungsprotein	Export	240 aa

5. Diskussion

Radical SAM Enzyme katalysieren eine Reihe ungewöhnlicher chemischer Transformationen. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse erweitern dieses Spektrum um eine ungewöhnliche Reaktion. Es konnte gezeigt werden, dass die Radical SAM Enzyme AlbA und SkfB für die Synthese der Thioetherbrücken in den Sactipeptiden Subtilosin A und SKF verantwortlich sind. Darüber hinaus wurde auf Grund der im Rahmen dieser Arbeit erzielten experimentellen Ergebnisse ein neuartiger Mechanismus ihrer Biosynthese postuliert.

5.1 Charakterisierung der Radical SAM Enzyme AlbA und SkfB

In den Diplomarbeiten von Michael Gattner (Gattner, 2010) und Leif Flöhe (Flöhe, 2010) wurden AlbA und SkfB bereits als Radical SAM Enzyme mit vermutlich zwei [4Fe-4S]-Clustern identifiziert. Da die Experimente, die zu diesen Schlussfolgerungen geführt haben, teilweise im Laufe dieser Arbeit wiederholt wurden, werden deren Ergebnisse im Folgenden erneut diskutiert.

5.1.1 Charakterisierung von AlbA und SkfB als Radical SAM Enzyme

AlbA und SkfB wurden durch Bestimmung der SAM-Spaltungsaktivität (Abbildungen 4.4 und 4.30) als Radical SAM Enzyme charakterisiert. Sie waren nur in der Lage, unter reduktiven Bedingungen die Spaltung von SAM in Met und 5'-dA zu katalysieren. Darüber hinaus läuft die Synthese von Met und dem 5'-dA-Radikal an einem Fe/S-Cluster ab, da nur die jeweils rekonstituierten Varianten der Enzyme in der Lage waren, hohe Mengen an Met und 5'-dA zu generieren. Mit nicht rekonstituierten SkfB und AlbA, war jeweils nur der Umsatz sehr kleiner Mengen SAM zu beobachten, was auf eine sehr geringe Beladung mit Fe/S-Clustern durch die in *E. coli* zuständige Fe/S-Cluster-Biosynthesemaschinerie schließen lässt. Für SkfB wurde zusätzlich die Zeitabhängigkeit der SAM-Spaltung untersucht (Abbildung 4.31). Das Enzym generiert in den getesteten Bedingungen schon nach 10 min mehr als zwei Äquivalente 5'-dA. Nach ungefähr 120 min hat die 5'-dA-Konzentration ein Plateau erreicht. Zu diesem Zeitpunkt hat das Enzym 12 Äquivalente SAM gespalten. Die Ergebnisse unterscheiden sich teilweise drastisch von denen anderer Radical SAM Enzyme. Bei der Lysin-2,3-Aminomutase und bei Viperin ist nur die Bildung von jeweils einem Äquivalent 5'-dA unter reduktiven Bedingungen und bei Abwesenheit des zweiten Substrats zu beobachten (Duschene and Broderick, 2010; Frey et al., 2008). Gründe für die geringe SAM-Spaltungsaktivität von Radical SAM Enzymen in Abwesenheit des zweiten Substrats wurden in der Einleitung erörtert. Aussagen, wieso AlbA und SkfB ein abweichendes Verhalten in der SAM-Spaltungsaktivität besitzen, können nicht gemacht werden. Auf Grund der hohen SAM-Spaltungsaktivität war die Bestimmung der genauen Stöchiometrie während der möglichen Thioetherbrückenbildung unmöglich.

5.1.2 AlbA und SkfB enthalten jeweils zwei [4Fe-4S]-Cluster

Im zweiten Schritt der Charakterisierung von AlbA und SkfB wurden die in den Enzymen vorkommenden Fe/S-Cluster genauer untersucht. Dafür wurde zunächst eine Eisen- und Schwefelbestimmung mit beiden rekonstituierten Enzymen durchgeführt. Der Eisen- und Sulfidgehalt lag bei beiden Proteinen mit 7.2 ± 0.3 (AlbA) bzw. 8.19 ± 0.07 (SkfB) Äquivalenten Eisen und 7.7 ± 0.4 (AlbA) bzw. 8.36 ± 0.14 (SkfB) Äquivalenten Sulfid deutlich höher als er für ein normales Radical SAM Enzym mit einem [4Fe-4S]-Cluster zu erwarten wäre (Abbildung 5.1).

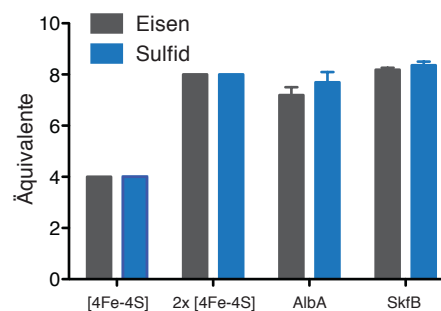


Abbildung 5.1: Balkendiagramme zur Übersicht über den zu erwartenden Eisen- und Sulfidgehalt in Enzymen, die ein oder zwei [4Fe-4S]-Cluster koordinieren. Der in AlbA und SkfB bestimmte Eisen- und Sulfidgehalt ist zum Vergleich mit gezeigt. Die Daten legen nahe, dass AlbA und SkfB zwei [4Fe-4S]-Cluster binden.

Bei den gemessenen Werten ist davon auszugehen, dass die beiden Enzyme einen weiteren Fe/S-Cluster binden. Um die Natur des zweiten in AlbA und SkfB gebundenen Fe/S-Cluster zu bestimmen wurden zunächst UV-Vis- und EPR-Spektren von reduzierten und nicht reduzierten AlbA bzw. SkfB aufgenommen (Abbildungen 4.7 und 4.33). In den UV-Vis-Spektren der jeweiligen nicht reduzierten Spezies sind Absorptionsbanden bei 325 nm und 410 nm zu beobachten die charakteristisch für [4Fe-4S]-Cluster enthaltende Proteine sind. In den EPR-Spektren von reduziertem AlbA bzw. SkfB sind die für [4Fe-4S]-Cluster typischen Signale bei $g = 1.92$ und $g = 2.03$ bzw. $g = 1.93$ und $g = 2.04$ zu erkennen. Die Ergebnisse legen nahe, dass AlbA und SkfB einen zweiten [4Fe-4S]-Cluster koordinieren. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden AlbA und SkfB-Mutanten generiert, in denen die Cysteine des CXXXCXXC-Motivs gegen Alaninruppen ausgetauscht wurden. Die Entfernung des ersten [4Fe-4S]-Clusters wurde durch Bestimmung der SAM-Spaltungsaktivität der rekonstituierten Mutanten bestätigt (Abbildungen 4.6 und 4.32). Anschließend wurden jeweils der Eisengehalt und die UV-Vis-, EPR- und temperaturabhängigen EPR-Spektren bestimmt. Der Eisengehalt reduzierte sich durch Deletion des ersten [4Fe-4S]-Clusters in AlbA auf 5.17 ± 0.15 Äquivalente und in SkfB auf 4.51 ± 0.16 Äquivalente Eisen, was jeweils auf einen zweiten [4Fe-4S]-Cluster schließen lässt. Die aufgenommenen UV-Vis- und EPR-Spektren (Abbildungen 4.8 und 4.34) schließen die Präsenz eines von

einem [4Fe-4S]- bzw. [2Fe-2S]-Cluster abweichenden Fe/S-Clusters aus. Durch die temperaturabhängigen EPR-Spektren konnte die Konstitution des jeweils zweiten gebundenen Fe/S-Clusters exakt bestimmt werden. Da in der AlbA^{C129A C133A C136A}- und in der SkfB^{C117A C121A C124A}-Mutante die maximale Signalintensität des EPR-Signals bei 30 K bzw. 20 K erreicht wird (Abbildungen 4.9 und 4.35), ist das Vorhandensein eines [2Fe-2S]-Clusters auszuschließen. Diese Fe/S-Cluster besaßen ihre maximale Signalintensität bei 60 K bis 70 K (Ugulava et al., 2001a). Andere Fe/S-Cluster als ein [4Fe-4S]-Cluster konnten durch die vorangegangenen Experimente ausgeschlossen werden. AlbA und SkfB binden daher jeweils zwei [4Fe-4S]-Cluster.

5.1.3 Bindungsmotiv der zweiten in AlbA und SkfB gebundenen [4Fe-4S]-Cluster

Zur Bestimmung des Bindungsmotivs der zweiten in AlbA und SkfB gebundenen [4Fe-4S]-Cluster wurde ein Alignment mit fünf an der Biosynthese von Sactipeptiden beteiligten Radical SAM Enzymen angefertigt (Abbildungen 4.21 und A.11). Es konnten drei konservierte, in der C-terminalen Region befindliche Cysteine bestimmt werden. Die AlbA- bzw. SkfB-Mutanten, in denen diese Cysteine gegen Alaningruppen ausgetauscht sind, besaßen einen deutlich geringeren Eisengehalt von 5.24 ± 0.25 bzw. 4.20 ± 0.11 Äquivalenten im Vergleich zu den Wild-Typ-Proteinen.

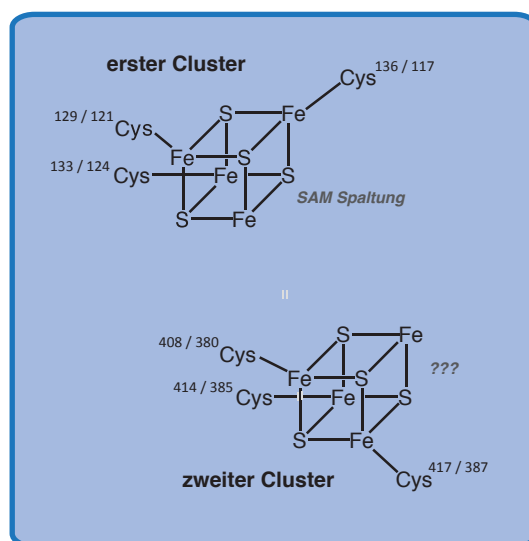


Abbildung 5.2: Überblick über die beiden in AlbA und SkfB gebundenen [4Fe-4S]-Cluster. Die erste Zahl bezieht sich auf den Aminosäurerest in AlbA, die zweite jeweils auf den Aminosäurerest in SkfB.

Der Eisengehalt in den Mutanten nahm im Vergleich zum Wild-Typ um das gleiche Maß ab wie der Eisengehalt in der AlbA- bzw. SkfB-Mutante des CXXXCXXC-Motivs im Vergleich zum Wild-typ. UV-Vis- und EPR-spektroskopische Untersuchungen zeigten, dass AlbA^{C408A C414A C417A} und

SkfB^{C380A C385A C387A} jeweils einen [4Fe-4S]-Cluster gebunden haben (Abbildungen 4.22 und 4.46). Die-SAM-Spaltungsaktivität blieb in den beiden Mutanten erhalten. In der AlbA-Mutante war die SAM-Spaltungsaktivität im Vergleich zum Wild-Typ-Protein stark verringert. Da beide Mutanten in der Lage sind, SAM reduktiv in Met und 5'-dA zu spalten, ist der durch das CXXXCXXC-Motiv gebundene [4Fe-4S]-Cluster intakt. Der zweite in AlbA und SkfB gebundene [4Fe-4S]-Cluster muss demnach über die Cysteine Cys408, Cys414 und Cys417 in AlbA und Cys480, Cys485 und Cys487 in SkfB koordiniert werden (Abbildung 5.2).

5.2 Studien zur Biosynthese von Subtilosin A

Im Folgenden werden die Ergebnisse, die in den Vorläuferpeptidmodifikationsassays mit dem Subtilosin A Vorläuferpeptid SboA und den SboA-Mutanten erzielt wurden, diskutiert.

Das Subtilosin A Vorläuferpeptid besitzt in Wasser nur eine sehr geringe, für Assays nicht ausreichende, Löslichkeit. Durch Zugabe von DMSO konnte seine Löslichkeit stark erhöht werden. Dadurch kommt es aber auch wegen der oxidativen Wirkung von DMSO zur Ausbildung einer Disulfidbrücke, wie in ersten massenspektrometrischen Untersuchungen von SboA gezeigt wurde (Abbildung 4.10). Deshalb wurden die Assays und Kontrollen nach der Reaktion teilweise mit Iodacetamid versetzt, um freie Cysteine zu modifizieren. So konnte zwischen der Bildung eines Thioethers und einer Disulfidbrücke unterschieden werden (Abbildung 4.11). Zusätzlich zur teilweisen Iodacetamidzugabe wurde ein Extraktionsverfahren für die HPLC-HRMS-Probenvorbereitung entwickelt. Alle Assays und Kontrollen wurden mit Methanol extrahiert, lyophilisiert und anschließend in Methanol, das 1 mM TCEP enthielt, gelöst, um die Disulfidbrückenbildung zu verhindern. Gleichzeitig wurde AlbA abgetrennt, um die Massenanalytik nicht zu behindern.

Vor Durchführung der Vorläuferpeptidmodifikationsassays wurde die SAM-Spaltungsaktivität von AlbA in Anwesenheit von DMSO überprüft. Es zeigte sich, dass AlbA bis zu einer Konzentration von ca. 22% DMSO aktiv ist. Weil SboA jedoch in 16% DMSO schon eine ausreichende Löslichkeit besitzt, wurde diese DMSO-Konzentration in den Assays verwendet.

5.2.1 Modifikationsassays mit SboA

Es wurden fünf verschiedene Modifikationsassays mit dem Subtilosin A Vorläuferpeptid SboA durchgeführt. Die Ergebnisse sind schematisch in Abbildung 5.3 zusammengefasst. Wie zu erwarten, wurden nach fünfstündiger Inkubation in der Kontrolle alle drei Cysteine durch Iodacetamidzugabe carbamidomethyliert. Nach Inkubation des Vorläuferpeptids mit AlbA ist diese Modifizierung nicht möglich. Die Cysteingruppen des Vorläuferpeptids haben demnach im Assay reagiert. Zusätzlich ist das im Assay erzeugte SboA-Derivat 6.062 Da leichter als das Ausgangsprodukt in der nicht mit Iodacetamid versetzten Kontrollreaktion. Da die Modifikation an

den Schwefelatomen der drei Cysteingruppen stattgefunden hat, ist bewiesen, dass AlbA die Thioetherbrücken in das SboA einführt. Die Erzeugung einer Thioetherbrücke vermindert die molekulare Masse des Peptids um durchschnittlich 2.021 Da, was in Übereinstimmung mit dem theoretisch zu erwarteten Massenshift von 2.016 Da ist. Der Assay ohne SAM bestätigt, dass die AlbA-katalysierte Reaktion SAM-abhängig ist und daher über einen radikalischen Mechanismus abläuft.

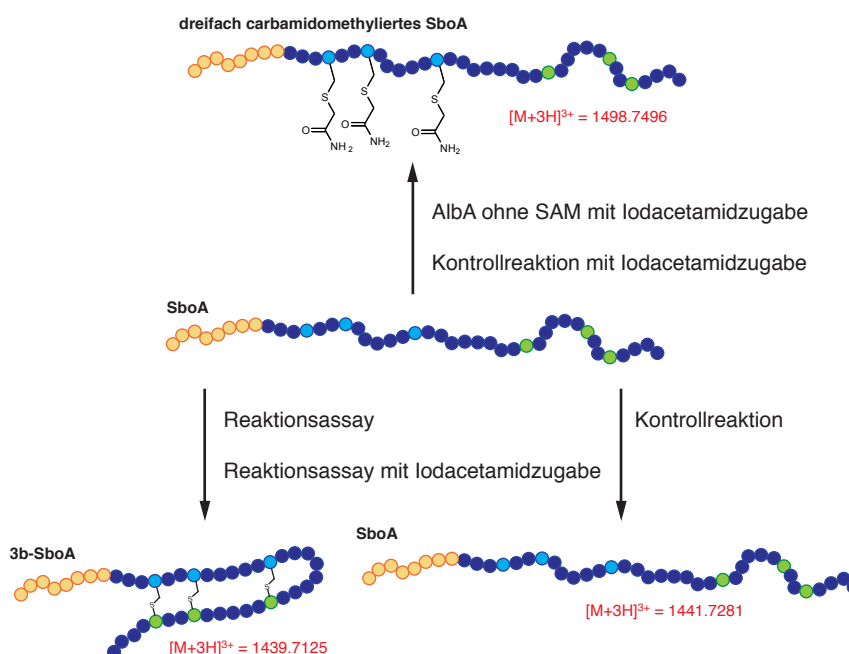


Abbildung 5.3: Schematische Übersicht über die Ergebnisse der Vorläuferpeptidmodifikationsassays mit SboA und AlbA. Im Reaktionsassay wird das dreifach thioetherverbrückte Subtilisin A Vorläuferpeptid gebildet, wohin gegen nach der Kontrolle alle drei Cysteingruppen mit Iodacetamid modifiziert werden.

Um zu überprüfen, ob die Thioetherbrücken regiospezifisch generiert wurden, wurde zunächst ein Thermolysinverdau mit dem durch AlbA modifizierten SboA durchgeführt. Es konnte ein Peptidfragment identifiziert werden, das auch im Thermolysinverdau von Subtilisin A gefunden wurde und die Thioetherbrücke von Cys13 zu Phe22 enthält. Durch Vergleich der MS-MS-Spektren der beiden Fragmente konnte die regiospezifische Bildung der Thioetherbindung zwischen den beiden Aminosäuren bewiesen werden. In einem zweiten Verfahren wurde 3b-SboA mit Hilfe der Carboxypeptidasen A und B verdaut. Als Hauptprodukt des Verdaus wurde dreifach verkürztes 3b-SboA identifiziert. Als Nebenprodukt wurde zweifach verkürztes 3b-SboA gefunden. Dieses Ergebnis deutet auf eine korrekt synthetisierte Thioetherbrücke zwischen Cys4 und Phe31 hin, da 3b-SboA um maximal drei C-terminale Aminosäuren verkürzt werden konnte. Die noch an der C-terminalen Seite an den Phenylalaninakzeptor gebundene Glycinegruppe konnte von den Carboxypeptidasen nicht entfernt werden, weil die Aktivität der Peptidasen durch die Thioetherbrücke für diese Position drastisch reduziert wurde. Bei zweifach

verkürztem 3b-SboA handelt es sich um noch nicht vollständig reagiertes Edukt. Ähnliche Ergebnisse wurden in den Carboxypeptidaseverdauen von entfädelten Lassozeptiden erzielt. Hier war es den eingesetzten Carboxypeptidasen auch nicht möglich, die letzte Aminosäure vor dem Macrolactamring zu entfernen (Knappe et al., 2009). In einem dritten Verfahren sollte die Regiospezifität durch *in vivo*-Studien zur Biosynthese von Subtilosin A untersucht werden. Die Diskussion dieser Ergebnisse findet sich in Kapitel 5.2.4.

5.2.2 Zeitabhängigkeit der Thioetherbrückenbildung

Die Zeitabhängigkeit der Thioetherbrückenbildung ist in Abbildung 4.20 gezeigt. Die Biosynthese von 3b-SboA verläuft über die Zwischenstufen 2b-SboA und 1b-SboA. Die Konzentration von 3b-SboA im Assay nimmt mit der Zeit stetig zu, wohin gegen die Konzentrationen von 2b-SboA und 1b-SboA durch ein Maximum laufen. Das Maximum der 1b-SboA-Konzentration liegt aller Voraussicht nach vor dem ersten Messpunkt bei 30 min. Weil nach 30 min Reaktionszeit 20% des Vorläuferpeptids als zweifach bzw. einfach verbrücktes SboA Derivat vorliegen, kann von einer konsekutiven Synthese der Thioetherbrücken durch AlbA ausgegangen werden. Als geschwindigkeitsbestimmender Schritt kommt die Biosynthese des 1b-SboA-Derivats in Frage, da diese erste Zwischenstufe besonders schnell in 2b-SboA und anschließend in 3b-SboA umgesetzt wird.

5.2.3 Modifikationsassays mit SboA-Varianten

Es wurden verschiedene SboA-Varianten in den Vorläuferpeptidmodifikationsassays untersucht um Rückschlüsse auf die Substraterkennung durch AlbA und die Reihenfolge der Thioetherbrückenbildung zu ziehen. Zur Bestimmung der Reihenfolge der Thioetherbildung wurden die SboA-Varianten SboA^{C4A}, SboA^{C7A} und SboA^{C13A} (Abbildung 5.4) hergestellt.

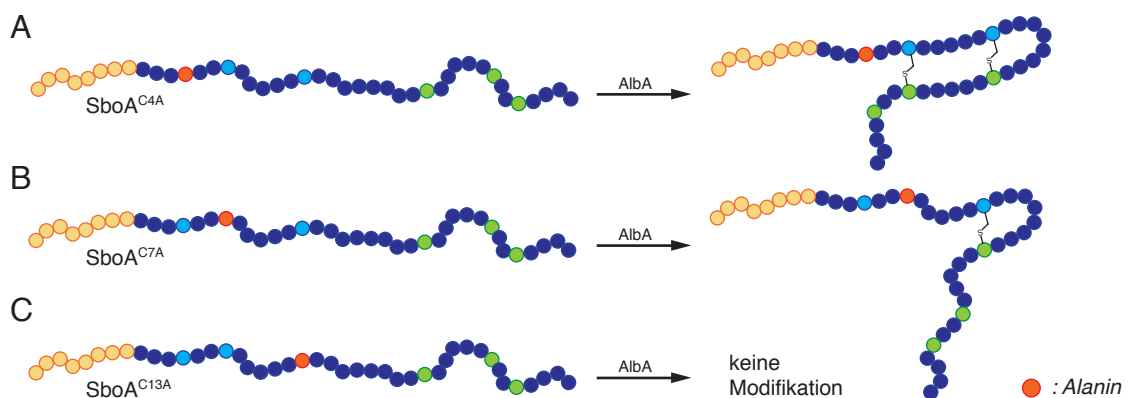


Abbildung 5.4: Übersicht über die in den Assays verwendeten SboA-Varianten. Mögliche Reaktionen sind nach den Thesen von Leif Flühe und Michael Gattner angegeben. Sie entpuppten sich aber als falsch.

In den Diplomarbeiten von Michael Gattner (Gattner, 2010) und Leif Flöhe (Flöhe, 2010) wurde die These formuliert, dass die Bildung der Thioetherbrücken nach einem Reißverschlussmechanismus abläuft. Demnach sollte der Thioether zwischen Cys13 und Phe22 als erste Bindung durch AlbA etabliert werden. Danach wäre es möglich, dass sich die Thioetherbrücke zwischen Cys7 und Thr28 und abschließend der Thioether zwischen Cys4 und Phe31 bildet. Mit Hilfe der bestellten SboA-Varianten sollte dieser Mechanismus bewiesen werden. In der SboA^{C4A}-Variante sollte daher die Bildung von zwei Thioetherbindungen beobachtet werden. In den SboA^{C7A}- und SboA^{C13A}-Varianten sollten hingegen nur die Bildung jeweils einer bzw. keiner Thioetherbrücke zu beobachten sein (Abbildung 5.4). Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse können den postulierten Mechanismus nicht bestätigen. In den beiden SboA-Varianten SboA^{C4A} und SboA^{C13A} ist die Bildung von zwei Thioetherbrücken zu beobachten, wohingegen in der SboA^{C7A}-Variante die Erzeugung eines Gemisches aus einfach und zweifach verbrücktem SboA-Derivat zu detektieren ist. Es scheint der Fall zu sein, dass AlbA zwei benachbarte Cysteine mit ähnlicher Effizienz mit den jeweiligen Akzeptoraminosäuren verknüpft, wie im Will-Typ-SboA. Fehlt jedoch die mittlere Cysteingruppe, ist die Bildung der zweiten Thioetherbrücke stark verlangsamt. Aus den erzielten Ergebnissen kann der vorgeschlagene Mechanismus weder widerlegt noch bestätigt werden. Auch können keine Aussagen zur Reihenfolge der Thioethergenerierung getroffen werden. Die nur teilweise Modifizierung der SboA^{C7A}-Variante legt nahe, dass eine gewisse Vorfaltung, die durch Bildung der Thioetherbrücken erzeugt wird, die Reaktion beschleunigt und die Effizienz des Enzyms erhöht.

Um Rückschlüsse auf die Substraterkennung durch AlbA, den Einfluss des Leaderpeptids auf die Thioetherbildung und die Biosynthese von Subtilosin A zu ziehen, wurden Vorläuferpeptidmodifikationsassays mit der leaderpeptidlosen SboA-Variante IISboA durchgeführt. Da im Assay nach Iodacetamidzugabe ausschließlich dreifach carbamidomethyliertes IISboA identifiziert werden konnte, ist bewiesen, dass AlbA nicht in der Lage ist, die Bildung der Thioetherbrücken an einem leaderpeptidlosen SboA-Derivat durchzuführen. Die Reaktion ist daher, wie viele andere postranslationale Modifizierungen von ribosomalen Peptiden, leaderpeptidabhängig (Arnison et al., 2012). Da vermutet wird, dass im zweiten Reaktionsschritt der Biosynthese von Subtilosin A das Leaderpeptid von einer der beiden putativen Proteasen AlbE und AlbF abgespalten wird, kann die leaderpeptidabhängige Thioetherbrückenbildung als erste Modifizierungsreaktion von SboA etabliert werden. Die daraus abgeleitete Biosynthese von Subtilosin A ist in Abbildung 5.5 gezeigt. Zunächst wird das Subtilosin A Vorläuferpeptid SboA durch die ribosomale Maschinerie assembliert. Im zweiten Schritt der Biosynthese erkennt AlbA das Peptid an Hand seiner Leadersequenz und katalysiert die Bildung der drei Thioetherbrücken. Anschließend ist entweder die putative Protease AlbE oder AlbF für die Abspaltung des Leaderpeptids verantwortlich. Im letzten Schritt der Biosynthese kommt es zur Ausbildung des zyklisierten

Peptidrückgrats, die ebenfalls durch einen der beiden putativen Proteasen durchgeführt wird. Nach erfolgreicher Synthese von Subtilosin A wird es durch den putativen ABC-Transporter AlbC aus der Zelle exportiert. Es ist ebenfalls möglich, dass AlbE und AlbF in einem Komplex arbeiten und gemeinsam die Abspaltung des Leaderpeptids und die Synthese des Makrozyklus katalysieren, ähnlich wie es für die Biosynthese von Lassozeptiden gezeigt wurde (Yan et al., 2012).

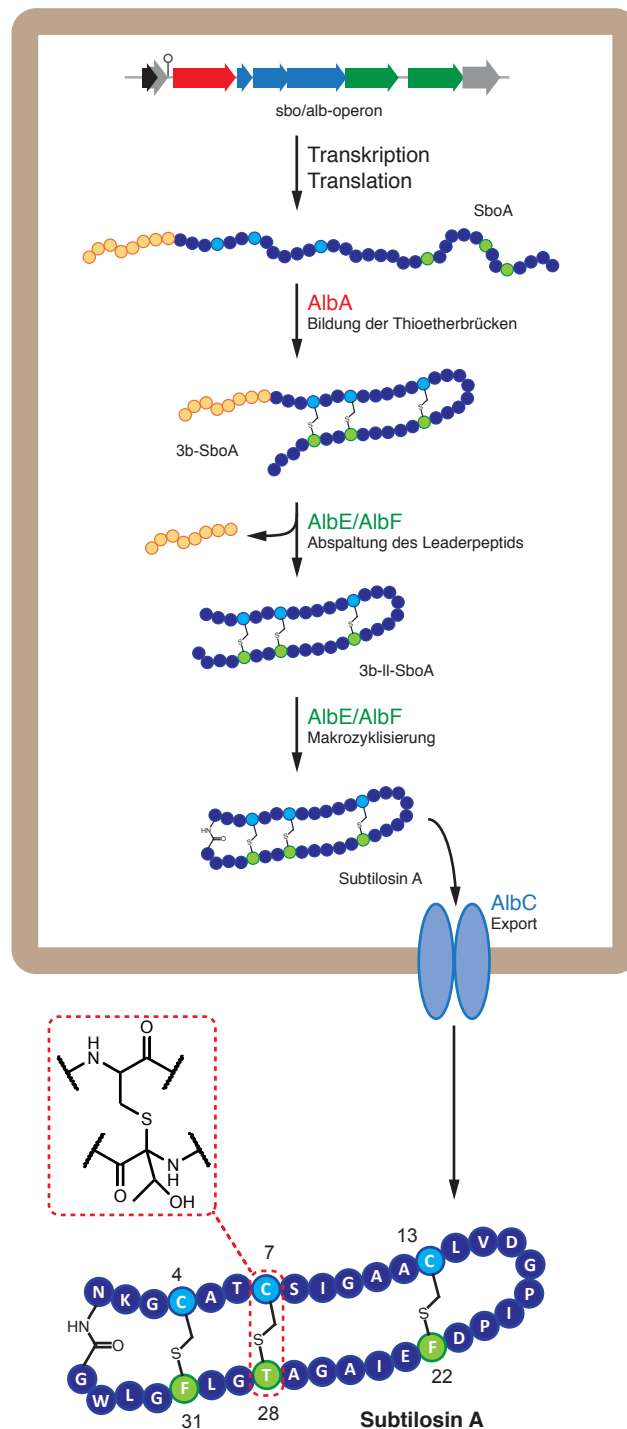


Abbildung 5.5: Postulierte Biosynthese von Subtilosin A. Erläuterungen befinden sich im Text.

5.2.4 Ergebnisse des *in vivo*-System

Mit Hilfe des *in vivo*-Systems, dass zur Produktion von Subtilosin A-Varianten diene, sollte die Regio- und Substratspezifität der AlbA-katalysierten Thioetherbrückenbildung untersucht werden. Es wurde von Michael Gattner im Laufe seiner Diplomarbeit entwickelt (Gattner, 2010). Zunächst sollte die Zuverlässigkeit des Systems überprüft werden. Dafür wurde das Gen der Subtilosin A^{T6I}-Variante, die bereits in der Literatur beschrieben ist und über eine hämolytische Aktivität verfügt, in den pDG-148-Vektor kloniert und in *B. subtilis* 168 unter Subtilosin A-produzierenden Bedingungen exprimiert. Die Bildung von Subtilosin A^{T6I} wurde im Zellpellet nur nach Induktion durch IPTG-Zugabe nachgewiesen, was die Zuverlässigkeit des *in vivo*-Systems bestätigt. Im zweiten Schritt zur Etablierung des *in vivo*-Systems wurden die folgenden *sboA*-Varianten durch IPTG-Zugabe exprimiert: *sboA*^{C4A}, *sboA*^{C7A} und *sboA*^{C13A}. Durch die *in vitro*-Assays mit den jeweiligen SboA-Varianten wurde gezeigt, dass AlbA in der Lage ist, in jedes der getesteten Genprodukte zwei Thioetherbrücken einzufügen. Mit Hilfe des *in vivo*-Systems sollte untersucht werden, ob die weitere Biosynthesemaschinerie diese zweifach verbrückten SboA-Varianten in die korrespondierende zweifach verbrückte Subtilosin A-Variante assemblieren kann. Es wurde in keinem Extrakt eine zweifach verbrückte Subtilosin A-Variante gefunden. Das bedeutet, dass die beiden putativen Proteasen AlbE und AlbF nicht in der Lage sind, zweifach verbrückte SboA-Varianten zu erkennen und weiter in das Endprodukt zu prozessieren.

Um die Regiospezifität der AlbA-katalysierten Reaktion zu bestimmen, wurden die *sboA*-Varianten *sboA*^{F22A}, *sboA*^{T28A}, *sboA*^{F31A} und *sboA*^{F31Y} exprimiert. Es konnte nur die Produktion von Subtilosin A^{F31Y} festgestellt werden. Das Ergebnis deutet darauf hin, dass es in den Alaninvarianten zur Ausbildung von zwei Thioetherbrücken durch AlbA kommt. Die dabei gebildeten 2b-SboA-Varianten können von der Biosynthesemaschinerie nicht weiter umgesetzt werden und resultieren folglich nicht in der Bildung der korrespondierenden Subtilosin A-Variante. Die durch AlbA erzeugten Thioetherbrücken werden daher regiospezifisch gebildet. Durch die Detektion der Subtilosin A^{F31Y}-Variante können erste Aussagen zur Substratspezifität von AlbA getroffen werden. Das Enzym scheint auf der Akzeptorseite strukturell verwandte Aminosäuren zu akzeptieren, weil Tyrosin im Vergleich zu Phenylalanin nur um eine zusätzliche Hydroxylfunktion verfügt.

Durch das *in vivo*-System sollte darüber hinaus noch die Fähigkeit von AlbA untersucht werden, die Bildung eines Ethers zu katalysieren. Dafür wurden die folgenden *sboA*-Varianten exprimiert: *sboA*^{C4S}, *sboA*^{C7S} und *sboA*^{C13S}. Nach erfolgreicher Induktion mit IPTG konnte keine der korrespondierenden Subtilosin A-Varianten in Zellpellet oder Überstand gefunden werden. Auf Grund dieser Tatsache ist davon auszugehen, dass AlbA nicht in der Lage war, die jeweils kor-

respondierende dreifach verbrückte SboA-Variante zu synthetisieren. AlbA ist daher nicht in der Lage, die Bildung eines Ethers zu katalysieren.

5.3 Studien zur Biosynthese des Sporulation Killing Factors

Im Folgenden werden die Ergebnisse, die in den Vorläuferpeptidmodifikationsassays mit SkfB und dem Vorläuferpeptid und den Vorläuferpeptidvarianten des Sporulation Killing Factors erzielt wurden, diskutiert.

Im Gegensatz zum Subtilisin A Vorläuferpeptid SboA wurde das SKF Vorläuferpeptid SkfA nicht per Auftragssynthese erhalten, sondern über heterologe Expression in *E. coli* als Trx-SkfA-Fusion hergestellt. Die anschließende proteolytische Spaltung mit Hilfe der TEV-Protease lieferte nach abschließender Reinigung per analytischer HPLC das reine SkfA-Derivat SerSkfA, was in anschließenden Vorläuferpeptidmodifikationsassays als Substrat eingesetzt wurde. Durch Herstellung des Vorläuferpeptids mittels heterologer Expression in *E. coli* konnten durch gezielte Mutation des *trx-skfA* Genes eine Vielzahl SerSkfA-Varianten erzeugt werden. Dadurch war es möglich, die Substratspezifität von SkfB hinsichtlich der Donor- und Akzeptoraminosäure zu untersuchen.

Das HPLC-HRMS-Programm zur Analytik der Vorläuferpeptidmodifikationsassays wurde mit einer *in-source*-Fragmentierung von 30 V erweitert, da in ersten massenanalytischen Untersuchungen von SerSkfA gezeigt wurde, dass es während des Ionisationsprozesses TFA-Addukte ausbildet. Diese TFA-Addukte konnten durch die *in-source*-Fragmentierung auf ein Minimum reduziert werden.

5.3.1 Vorläuferpeptidmodifikationsassays mit SerSkfA

Das SKF Vorläuferpeptid SerSkfA verfügt über drei Cysteingruppen. Während der oxidativen Probenvorbereitung für die HPLC-HRMS-Analyse kann es daher zur Ausbildung einer Disulfidbrücke kommen. In der SkfB-katalysierten Reaktion wird voraussichtlich eine Thioetherbrücke gebildet, die durch massenspektrometrische Analytik nicht von einer Disulfidbrücke, die sich ebenfalls unter den experimentellen Bedingungen formieren kann, unterschieden werden kann. Daher wurden je ein Reaktionsassay und eine Kontrolle nach vierstündiger Inkubation mit Iodacetamid versetzt, um zwischen Disulfidbrückenbildung und Thioetherformierung zu unterscheiden (siehe Kapitel 5.2). Der Assay und die Kontrolle, die nicht mit Iodacetamid versetzt wurden, wurden nach vierstündiger Inkubation mit Luft durchflutet, um nicht modifizierte Cysteingruppen zu verbrücken. Deshalb sollte in der Kontrollreaktion ausschließlich einfach verbrücktes SerSkfA zu finden sein. Im Assay hingegen sollte zusätzlich zweifach verbrücktes SerSkfA zu detektieren sein, falls SkfB die Thioetherbrückenbildung katalysiert, da die zwei ver-

bliebenen Cysteinreste weiterhin eine Disulfidbrücke, wie in SKF, ausbilden können. Durch das Verhältnis der Flächen unter den extrahierten Ionenchromatogrammen von 1b-SerSkfA und 2b-SerSkfA kann auf den Umsatz geschlossen werden.

Die extrahierten Ionenchromatogramme und Massenspektren der HPLC-HRMS-Analysen der Assays und Kontrollen mit SerSkfA sind in den Abbildungen 4.39 und A.19 gezeigt. In der Kontrolle ist nach Luftzugabe ausschließlich einfach verbrücktes SerSkfA zu identifizieren. Es kam demnach zur Ausbildung einer Disulfidbrücke, da in der Kontrolle mit Iodacetamidzugabe alle drei Cysteingruppen modifiziert werden konnten. Im Assay ist zusätzlich 2b-SerSkfA zu beobachten. Es macht 56% der Gesamtmenge an detektierten SerSkfA-Derivaten aus. Durch die Zugabe von Iodacetamid lassen sich nur zwei Cysteinreste modifizieren, was beweist, dass SkfB die Synthese der Thioetherbrücke im Sporulation Killing Factor katalysiert. Eine Übersicht über die beobachteten Reaktionen gibt Abbildung 5.6. Durch die Ergebnisse ist ebenfalls bewiesen, dass das 2b-SerSkfA-Reaktionsprodukt über eine Disulfidbrücke und einen Thioether verfügt. In nachfolgenden Assays kann demnach die Generierung eines Thioethers durch die Identifizierung des korrespondierenden 2b-SerSkfA-Reaktionsproduktes erfolgen.

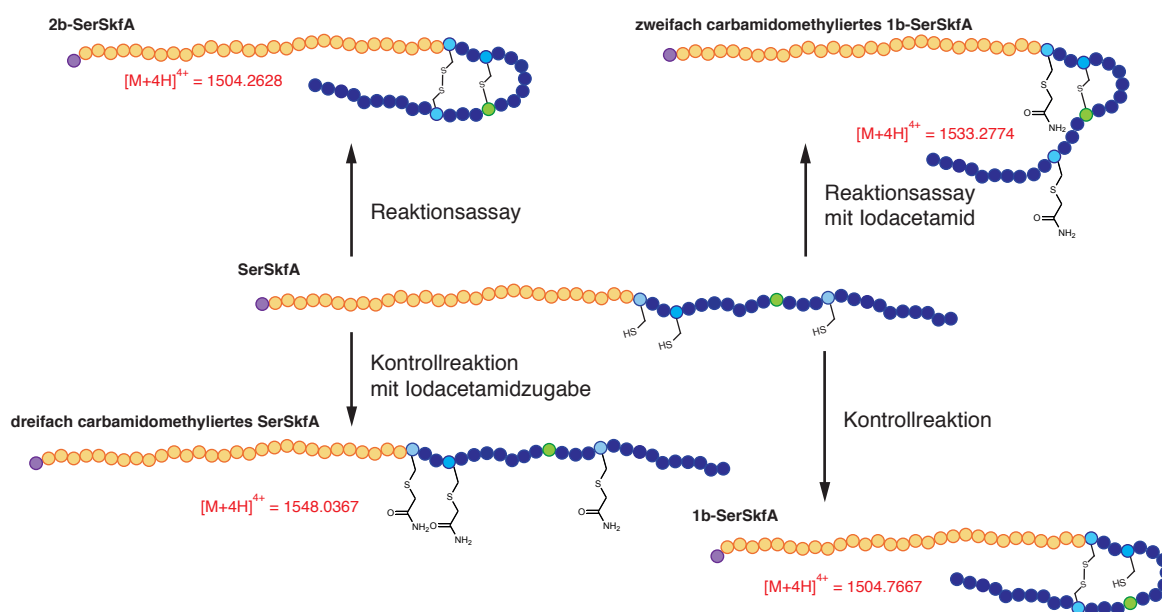


Abbildung 5.6: Schematische Übersicht über die SerSkfA-Derivate, die in den verschiedenen Vorläuferpeptidmodifikationsassays gebildet werden. SkfB katalysiert die Synthese eines Thioethers.

5.3.2 Modifikationsassays mit SerSkfA-Varianten der Akzeptorposition

Um die Substratspezifität von SkfB hinsichtlich der Akzeptorposition (Met12) der Thioetherbindung zu untersuchen, wurden zehn SerSkfA-Varianten generiert, die eine Variation in der Aminosäure Met12 besaßen. Als Austauschpartner wurden die Aminosäuren Ala, Leu, Tyr, Ser,

Glu, Lys, Gln, Thr, Phe und Asn gewählt, weil sie entweder eine ähnliche räumliche Struktur wie Met aufweisen (Glu, Gln, Leu, Asn) oder als Akzeptor in anderen Sactipeptiden vorkommen (Phe, Thr, Ala, Ser, Lys, Tyr). Die Ergebnisse der Assays und Kontrollen sind in den Tabellen 4.6 und 4.7 zusammengefasst. Es wurde auf die Zugabe von Iodacetamid verzichtet, weil durch Detektion einer zweifach verbrückten SerSkfA-Variante die Erzeugung eines Thioethers durch SkfB bewiesen ist (siehe Kapitel 5.3.1). Der Anteil an umgesetztem Edukt variiert bei den verschiedenen SerSkfA-Spezies zwischen 0% und 63% (Abbildung 5.7). Die Akzeptoraminosäuren können in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden: 1.) große hydrophile AS, wie Glu, Lys und Gln, 2.) eher kleinere hydrophile AS wie Thr, Asn und Ser und 3.) hydrophobe und aromatische AS wie Ala, Phe, Tyr und Leu. Die SerSkfA-Varianten, in denen Met12 gegen eine hydrophobe oder aromatische Aminosäure ausgetauscht wurde, wurden durch SkfB in ähnlichen Mengen wie der Wild-Typ-SerSkfA umgesetzt. Beim Austausch des Akzeptors zu Tyrosin wurde sogar eine größere Verknüpfungsaktivität festgestellt. SerSkfA-Substrate mit kleinen hydrophilen Aminosäuren an der Akzeptorposition wurden in einem geringeren Ausmaß in die thioetherverbrückte Form überführt. Der Umsatz nach vierstündiger Inkubation lag nur bei 19% bis 26%. SerSkfA-Varianten mit großen hydrophilen Akzeptoraminosäuren wurden von SkfB nicht mehr als Substrat erkannt. Es wurden jeweils nur die einfach verbrückten SerSkfA-Varianten in den zugehörigen Assays detektiert. Daher ist bewiesen, dass die Vorläuferpeptide vom Enzym nicht modifiziert wurden.

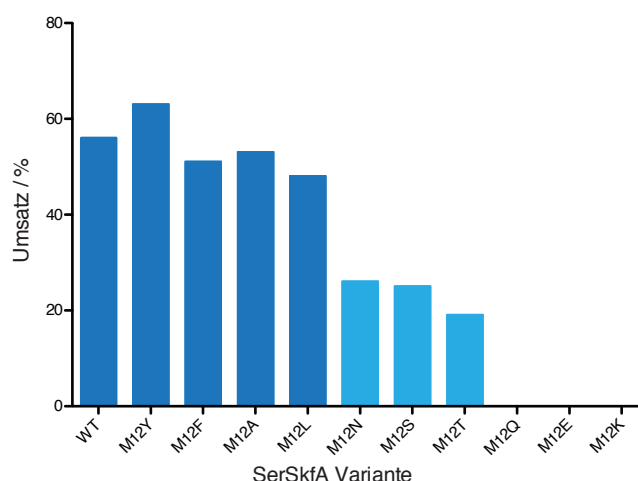


Abbildung 5.7: Übersicht über die umgesetzte Menge an jeweiliger SerSkfA-Variante in den Vorläuferpeptidmodifikationsassays in das korrespondierende thioetherverbrückte Produkt.

Aus den Ergebnissen ist eine hohe Toleranz für hydrophobe und kleinere hydrophile Aminosäuren von SkfB im Bezug auf die Akzeptorposition in SkfA abzuleiten. Das Enzym scheint für die-

se Position im aktiven Zentrum über eine große hydrophobe Tasche zu verfügen, in der auch kleinere hydrophile Aminosäuren - wie z. B. Serin - Platz finden und daher modifiziert werden, wenn auch mit geringerem Umsatz. Daraus ist ebenfalls abzuleiten, dass der an der Seitenkette gebundene Aminosäurerest keine Rolle während der Bildung des kohlenstoffzentrierten Radikals am α -Kohlenstoffatom spielt.

5.3.3 Modifikationsassays mit SerSkfA-Varianten der Donorposition

Mit Hilfe des Austausches der Donoraminosäure Cys4 gegen Alanin und Serin sollte unter anderem die Regiospezifität der Thioetherbrückenbildung gegenüber dem Donor Cys4 bestimmt werden. Darüber hinaus sollte durch den Austausch des Cysteins gegen Serin überprüft werden, ob SkfB in der Lage ist, die Synthese eines Ethers zu katalysieren. Erste *in vivo*-Ergebnisse von AlbA legen nahe, dass die Enzymklasse dazu nicht in der Lage ist.

Die SerSkfA^{C4A}-Variante wurde nicht von SkfB modifiziert. Nach vierstündiger Inkubation ließen sich beide freien Cysteine durch Iodacetamid carbamidomethylieren. Dadurch wurde bewiesen, dass die Thioetherbrücke spezifisch vom Cysteinrest Cys4 ausgeht. Die beiden anderen Cysteine (Cys1 und Cys16) werden durch SkfB nicht modifiziert und bilden demnach die Disulfidbrücke im fertig assemblierten Produkt aus.

Die SerSkfA^{C4S}-Variante wurde ebenfalls nicht von SkfB als Substrat akzeptiert. Dieses Ergebnis bestätigt die Vermutung, dass die hier untersuchte Klasse von Radical SAM Enzymen nicht in der Lage ist, die Synthese eines Ethers zu katalysieren. Auf die mechanistischen Auswirkungen dieser Entdeckung wird in Kapitel 5.4 detailliert eingegangen.

Neben den beiden SerSkfA-Donorvarianten wurde auch die SerSkfA^{C4M M12C}-Mutante, in der die Position der Donor- und Akzeptoraminosäure ausgetauscht sind, durch heterologe Expression in *E. coli* hergestellt. Ziel des Assays mit dieser SerSkfA-Variante war es, herauszufinden, ob SkfB in der Lage ist, die Synthese eines invertierten Thioethers zu generieren. Da im Assay nur einfach verbrücktes SerSkfA^{C4M M12C} gefunden werden konnte, ist SkfB dazu nicht in der Lage. Die richtigen Positionen der Donor- und Akzeptoraminosäure sind für die Erkennung des Substrats unerlässlich. Die Tatsache, dass SkfB diese Art der Thioetherbrückenbindung nicht katalysieren kann, wird in Kapitel 5.4 auf Grundlage des postulierten Mechanismus diskutiert.

5.3.4 Modifikationsassays mit der leaderpeptidlosen SkfA-Variante lISkfA

Die Assays mit der leaderpeptidlosen SkfA-Variante lISkfA wurden durchgeführt, um zu überprüfen, ob die SkfB-katalysierte Thioetherbrückenbildung Leaderpeptid-abhängig ist und daher den ersten Schritt in der Biosynthese des Sporulation Killing Factor bildet. Die Vermutung, dass die

Reaktion Leaderpeptid-abhängig ist, liegt nahe, da dies für die AlbA katalysierte Generierung der Thioetherbindungen zutrifft.

Wie erwartet, wurde die leaderpeptidlose SkfA-Variante von SkfB nicht modifiziert, da die drei in lISkfA vorkommenden Cysteingruppen nach vierstündiger Inkubation durch Iodacetamid modifiziert werden konnten. Die SkfB-katalysierte Reaktion ist wie die AlbA-katalysierte Thioetherbrückenbildung abhängig vom Leaderpeptid und bildet demnach den ersten Schritt in der Biosynthese von SKF (Abbildung 5.8). Danach wird 1b-SkfA zu einem Komplex transportiert, der aus der Membran-stämmigen putativen Protease SkfC und dem Transmembranexporter SkfE besteht. Dieser Komplex katalysiert die proteolytische Abspaltung des Leaderpeptids von 1b-SkfA, die Zyklisierung des Peptidrückgrats und den anschließenden Export aus der Zelle. Durch die oxidativen Bedingungen, die außerhalb der Zelle herrschen, kann es zur Bildung der Disulfidbrücke und der vollständigen Assemblierung von SKF kommen. Der in dieser Arbeit vorgeschlagene Mechanismus basiert auf weiten Teilen auf der von *Liu et al.* postulierten Biosynthese (Liu et al., 2010). Im Gegensatz zu *Liu et al.* wird hier die Disulfidbrückenbildung als Resultat der oxidativen Bedingungen außerhalb der Zelle postuliert und nicht als eine durch das Thioredoxin katalysierte Reaktion, da im Rahmen dieser Arbeit in den Assays mit den verschiedenen SerSkfA-Varianten gezeigt werden konnte, dass es sich bei der Disulfidbrückenbildung um eine intrinsische Reaktion unter oxidativen Bedingungen handelt.

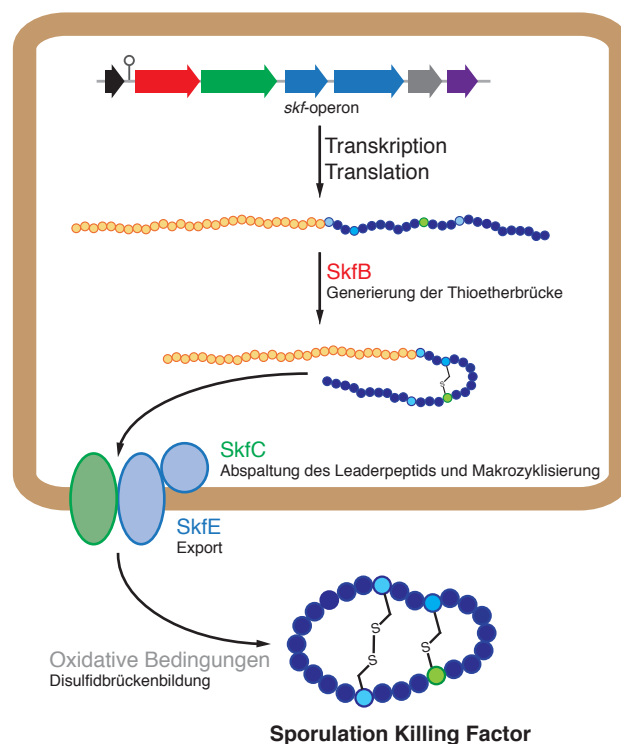


Abbildung 5.8: Überblick über die postulierte Biosynthese des Sporulation Killing Factors.

5.4 Mechanismus der Thioetherbrückenbildung

In ribosomal produzierten Peptiden kommen Thioetherbrücken in Sactipeptiden, Lanthipeptiden, Labyrinthopeptiden und Cyclothiazomycin vor. Die in Lanthi- und Labyrinthopeptiden ausgebildeten Thioetherbindungen verbrücken das Schwefelatom einer Cysteingruppe mit dem β -Kohlenstoffatom eines Serin- oder Threoninrestes (Kapitel 1.2.2). Die Biosynthese verläuft über die Dehydratation des Serin- oder Threoninrestes und anschließende nukleophile Addition des Schwefelatoms an das elektrophile β -Kohlenstoffatom des gebildeten Dehydrobutyrin- oder Dehydroalaninrestes. Die Bildung des Thioethers in Cyclothiazomycin verläuft über einen ähnlichen Mechanismus, nur dass im letzten Reaktionsschritt das Schwefelatom eines Cysteinrestes mit dem α -Kohlenstoffatom der dehydratisierten Akzeptoraminosäure verknüpft wird. Solch ein Mechanismus kann aus mehreren Gründen für die Biosynthese der Thioetherbrücken in Sactipeptiden ausgeschlossen werden. Erstens kommen in den Biosynthesegenclustern keine zu den Lanthioninsynthetasen homologen Enzyme vor und zweitens können die meisten Akzeptoraminosäuren in Sactipeptiden nicht dehydratisiert werden, um das korrespondierende α,β -ungesättigte-Derivat zu bilden. Darüber hinaus konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass Radical SAM Enzyme für die Synthese der Thioetherbrücken in Sactipeptiden verantwortlich sind. Dessen Biosynthese muss folglich über einen völlig neuartigen Mechanismus mit radikalischen Zwischenstufen ablaufen.

Um einen möglichst genauen Mechanismus für die AlbA- bzw. SkfB-katalysierte Reaktion zu postulieren, wurden Modifikationsassays mit AlbA^{C408A C414A C417A} und der SkfB^{C380A C385A C387A}-Mutante durchgeführt. Beide Radical SAM Enzym-Varianten waren nicht mehr in der Lage, die Generierung der jeweiligen Thioetherbindungen zu katalysieren. In den Assays konnte nur nicht verbrücktes SboA bzw. einfach verbrücktes SerSkfA detektiert werden. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der zweite in AlbA und SkfB gebundene [4Fe-4S]-Cluster eine entscheidende Rolle während der Biosynthese der Bindung spielt. Zu dem Zeitpunkt, als diese Ergebnisse erzielt wurden, war der Mechanismus der von BtrN bzw. AtsB katalysierten zwei Elektronen-Oxidation bekannt (Kapitel 1.3.9 und 1.3.10) (Grove et al., 2008; 2010). In den beiden Mechanismen wurde postuliert, dass der in BtrN- bzw. AtsB-gebundene zweite [4Fe-4S]-Cluster das Substrat koordiniert und neben dem 5'-dA-Radikal als zweites ein-Elektronen-Oxidationsmittel Verwendung findet. Bei der AlbA- und SkfB-katalysierten Thioetherbildung handelt es sich ebenfalls um eine zwei-Elektronen-Oxidation. Durch UV-Vis-Interaktionsstudien mit AlbA, AlbA-Varianten, SboA und lISboA (Kapitel 4.1.15) sollte überprüft werden, ob eine Interaktion zwischen dem zweiten in AlbA gebundenen Cluster und dem Vorläuferpeptid SboA vorliegt. Die Annahme war, dass es bei einer Interaktion mit einem Eisen-Schwefel-Cluster zu einer Veränderung des Oxidationszustandes des Clusters kommt. Diese teilweise Reduktion

sollte mit einer Verringerung der für [4Fe-4S]-Cluster charakteristischen Absorptionsbande bei 410 nm einhergehen. Es wurden die UV-Vis-Spektren der drei AlbA-Varianten AlbA, AlbA^{C129A C133A C136A} und AlbA^{C408A C414A C417A}, die jeweils mit SboA, IISboA oder ohne Vorläuferpeptid versetzt waren, gemessen. Im Spektrum von mit SboA versetztem AlbA konnte eine Abnahme der charakteristischen Absorption bei 410 nm beobachtet werden. Diese Abnahme war nicht nach Zugabe von IISboA zu identifizieren, auch dann nicht, als die AlbA-Variante AlbA^{C408A C414A C417A} verwendet wurde. Die charakteristische Abnahme war erneut im Spektrum der AlbA-Variante AlbA^{C129A C133A C136A} zu erkennen, der SboA zugegeben wurde. Diese Ergebnisse beweisen eine Wechselwirkung zwischen dem zweiten durch das Enzym gebundenen [4Fe-4S]-Cluster und dem Vorläuferpeptid SboA. Es ist wahrscheinlich, dass das Schwefelatom einer Cysteingruppe an das einzigartige Eisen des zweiten [4Fe-4S]-Cluster koordiniert. Auf Grundlage dieser Ergebnisse kann ein plausibler Mechanismus für die AlbA- und SkfB-katalysierte Thioetherbrückenbildung postuliert werden (Abbildung 5.9).

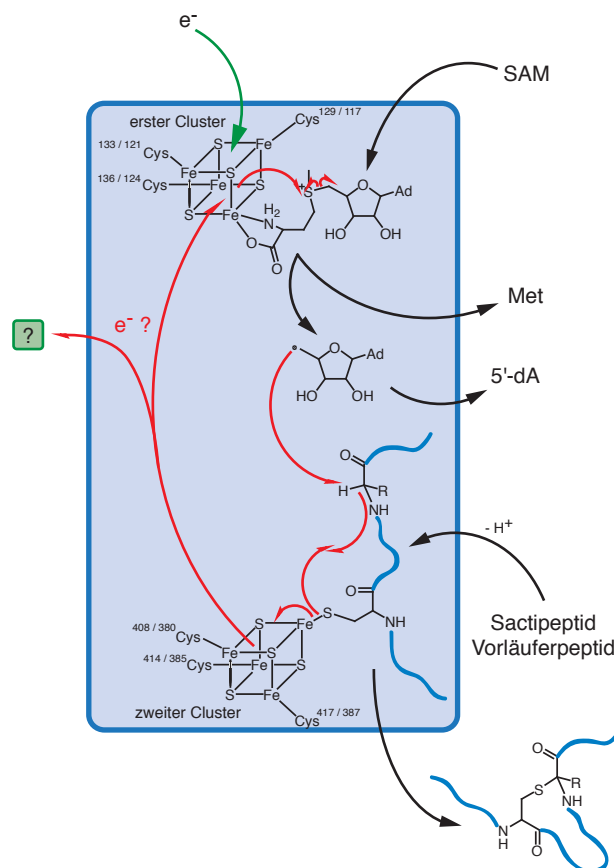


Abbildung 5.9: Postulierter Reaktionsmechanismus der Radical SAM Enzym-katalysierten Thioetherbildung. Eine detaillierte Beschreibung des Mechanismus findet sich im Text.

Im ersten Reaktionsschritt koordiniert SAM an das einzigartige Eisenatom des nicht reduzierten [4Fe-4S]-Clusters, der über das CXXXCXXC-Motiv gebunden ist. Dieser Fe/S-Cluster wird im zweiten Reaktionsschritt durch ein externes ein-Elektronen-Reduktionsmittel reduziert und ist dementsprechend in der Lage, im dritten Reaktionsschritt ein Elektron auf die Sulfoniumgruppe von SAM zu übertragen. Dadurch wird SAM in Methionin und das 5'-dA-Radikal gespalten. Währenddessen koordiniert ein Cysteinrest eines Sactipeptidvorläuferpeptides an das einzigartige Eisenatom des zweiten in AlbA und SkfB gebundenen [4Fe-4S]-Clusters. Das Vorläuferpeptid wird dadurch im Enzym ausgerichtet, so dass das erzeugte 5'-dA-Radikal das Wasserstoffatom des α -Kohlenstoffatoms der Akzeptoraminosäure unter Generierung eines kohlenstoffzentrierten Radikals abstrahieren kann. Das neu gebildete kohlenstoffzentrierte Radikal wird durch die Amidbindungen des Peptidrückgrates stabilisiert. Im nächsten Reaktionsschritt dient der zweite [4Fe-4S]-Cluster als ein-Elektronen-Oxidationsmittel. Er nimmt ein Elektron der koordinierten Sulfidgruppe auf. Dadurch kann es im nächsten Reaktionsschritt zur Kombination des schwefel- und kohlenstoffzentrierten Radikals kommen, einhergehend mit der Bildung der für Sactipeptide charakteristischen Thioetherbrücke. Der zweite [4Fe-4S]-Cluster liegt nach dem Reaktionszyklus in der reduzierten, nicht aktiven Form vor. In den Assays mit AlbA und SkfB wurde gezeigt, dass die Reaktion katalytisch abläuft. Der zweite [4Fe-4S]-Cluster muss demnach nach dem Reaktionszyklus regeneriert werden. Das wird einerseits durch den Transfer des Elektrons auf einen externen Elektronenakzeptor oder andererseits durch den Transfer des Elektrons auf den ersten [4Fe-4S]-Cluster erreicht. Der erste [4Fe-4S]-Cluster würde durch den Elektronentransfer in die aktive Form übergehen und wäre demnach in der Lage, SAM für einen weiteren Turnover zu spalten. Da in den Assays kein zusätzlicher Elektronenakzeptor vorhanden war, ist davon auszugehen, dass der reduzierte zweite [4Fe-4S]-Cluster das Elektron auf den durch das CXXXCXXC-Motiv gebundenen [4Fe-4S]-Cluster überträgt. Für diesen Mechanismus spricht zusätzlich die Tatsache, dass die SAM-Spaltungsaktivität von AlbA durch Entfernung des zweiten [4Fe-4S] von 8 auf 0.7 Äquivalente reduziert wurde.

Durch den vorgeschlagenen Mechanismus können die in den *in vitro*-Assays mit SerSkfA-Varianten und SkfB erzielten Ergebnisse erklärt werden. Durch den Assay mit der SerSkfA^{C4S}-Variante wurde gezeigt, dass SkfB nicht in der Lage ist, Etherbindungen zu synthetisieren. Laut Mechanismus läuft die Biosynthese der Thioetherbindung über ein Intermediat ab, in dem sich eine Eisen-Schwefel-Bindung ausbildet. Während der Ethersynthese müsste sich daher eine Eisen-Sauerstoff-Bindung ausbilden. Auf Grund der Tatsache, dass Sauerstoff zu Eisen eine viel höhere Affinität aufweist als Schwefel zu Eisen, kann davon ausgegangen werden, dass das gebildete Intermediat mit der Eisen-Sauerstoffbindung nicht weiter reagieren kann. Daher kommt es nicht zur Synthese der Etherbindung. In den Assays wurde ebenfalls gezeigt, dass SkfB nicht in der Lage ist, die Bildung einer invertierten Thioetherbrücke zu katalysieren. Dies

kann, wie folgt durch den postulierten Mechanismus erklärt werden. Das Schwefelatom des Cysteinrestes wird während der Synthese des Thioethers an das einzigartige Eisenatom des zweiten [4Fe-4S]-Clusters koordiniert. Die Bildung dieses Komplexes wird verhindert, wenn der Cysteinrest an der Position der Akzeptoraminosäure vorliegt. Dadurch kann es nicht zur Bildung des Thioethers durch SkfB kommen.

Der in dieser Arbeit postulierte Mechanismus für die Thioetherbrückenbildung in Sactipeptiden weist Parallelen zum Mechanismus der SAM-abhängigen Methylthiotransferasen MiaB und RimO auf (Kapitel 1.3.4). In dem von *Forouhar et al.* postulierten Mechanismus kommt es auch zur Ausbildung eines Komplexes aus dem zweiten [4Fe-4S]-Cluster und einer Methylthiolgruppe, die über das Schwefelatom an ein Eisenatom des Clusters koordiniert ist (Forouhar et al., 2013). Wie bei AtsB und BtrN dient auch hier der zweite [4Fe-4S] als zweites ein-Elektronen-Oxidationsmittel. Zwar sind erst wenige katalytisch ablaufende durch Radical SAM Enzyme vermittelte Thioetherbrückenbildungsreaktionen charakterisiert. Es lassen sich aber zum jetzigen Zeitpunkt auf Grund der Parallelen in den postulierten Mechanismen schon einige allgemeingültige Aussagen treffen. Der zweite [4Fe-4S]-Cluster scheint die Funktion des zweiten ein-Elektronen Oxidationsmittels einzunehmen. Darüber hinaus kommt es zur Ausbildung eines Komplexes, der aus diesem [4Fe-4S]-Cluster und dem Substrat besteht. Das Substrat ist über ein Schwefelatom an das einzigartige Eisenatom des Fe/S-Clusters an den Cluster koordiniert. Aus diesem Komplex kommt es zur Elektronenübertragung auf das zweite ein-Elektronen Oxidationsmittel. Die Regeneration des zweiten [4Fe-4S]-Clusters durch Übertragung eines Elektrons auf den ersten [4Fe-4S]-Cluster ist beiden Mechanismen ebenfalls gleich.

5.5 zukünftige Forschungsschwerpunkte

Abbildung 5.10 liefert einen Überblick über die in AlbA enthaltenen Domänen. Neben der Radical SAM-Domäne und der SPASM-Domäne, die für die Bindung des zweiten [4Fe-4S]-Clusters verantwortlich ist, verfügt AlbA über eine dritte Domäne, die homolog zu PqqD ist.

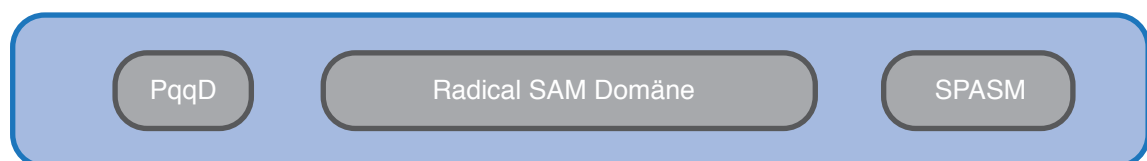


Abbildung 5.10: Übersicht über die in AlbA enthaltene Domänen.

PqqD ist ein Protein, das in der Biosynthese von PQQ (Kapitel 1.2.7) involviert ist. Es wird angenommen, dass PqqD für die Erkennung des Vorläuferpeptids verantwortlich ist und mit PqqA einen Komplex bildet. Es könnte ebenfalls gezeigt werden, dass PqqD mit PqqE, einem Radical SAM Enzym, einen Komplex bildet. Daher wird angenommen, dass nach Erkennung von PqqA durch PqqD ein PqqA-PqqD-PqqE-Komplex gebildet wird, der die erste Reaktion in der Biosynthese von PQQ katalysiert. Bis zum heutigen Zeitpunkt konnte diese Hypothese nicht bestätigt werden. In Abbildung 5.11 sind die berechneten Kristallstrukturen von AlbA und SkfB gezeigt.

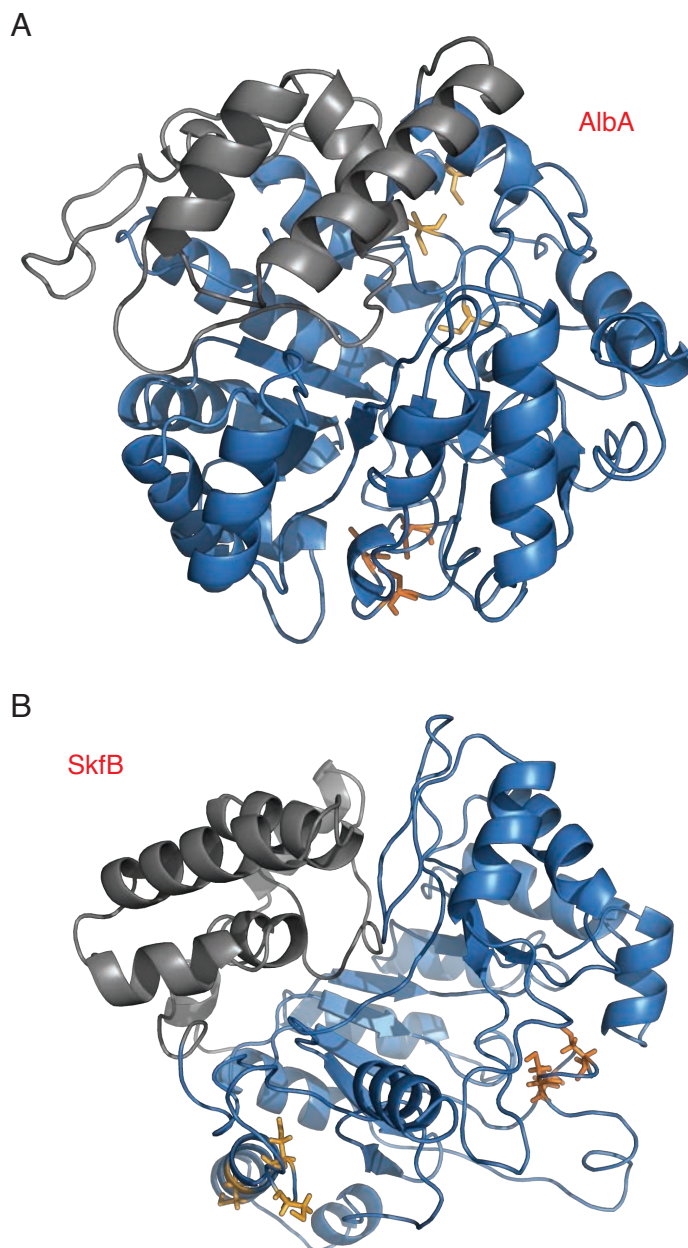


Abbildung 5.11: Mit iTasser berechnete Strukturen von AlbA (A) und SkfB (B). Die PqqD-Domäne ist in beiden Strukturen grau hervorgehoben und ist wie ein Deckel zum *TIM-barrel* angeordnet. Die Cysteine des CXXXCXXC-Motivs sind dunkelorange, die der zweiten Clusterbindungsstelle hellorange. In beiden Strukturen sind die Cysteine der zweiten Clusterbindungsstelle näher an der PqqD-Domäne angeordnet als die Cysteine des CXXXCXXC-Motivs. Diese Tatsache könnte dafür sprechen, dass der zweite Cluster in der Koordination des Peptidsubstrates beteiligt ist. Der *TM-score* betrug für AlbA 0.54 und für SkfB 0.43.

Eine Kristallstruktur von SkfB lag zum Abgabzeitpunkt dieser Arbeit trotz intensiver Bemühungen noch nicht vor. Die jeweilige N-terminale PqqD-Domäne ist farblich hervorgehoben. Die Radical SAM- und SPASM-Domänen bilden die für Radical SAM Enzyme typische *TIM-barrel* Faltung aus. Beide [4Fe-4S]-Cluster werden in der Fassstruktur gebunden, wobei die zweite [4Fe-4S]-Cluster-Bindungsstelle in beiden Enzymen in einem Gebiet liegt, in dem die Struktur mit einer geringen Genauigkeit berechnet wurde. Die PqqD-Domäne bildet in beiden Enzymen eine Art Deckel aus. Hier ist zu vermuten, dass dieser Deckel für die Erkennung des Vorläuferpeptids verantwortlich ist. Nach Bindung des Peptids könnte es zu einer Konformationsänderung kommen. Diese würde dazu führen, dass sich der Deckel der Fassstruktur annähert und diese verschließt. Das Vorläuferpeptid wäre dann im aktiven Zentrum des Enzyms koordiniert. Die Synthese der Thioetherbrücken könnte beginnen. Zusätzlich wären die beiden [4Fe-4S]-Cluster vor eindringenden Wassermolekülen optimal geschützt.

Darüber hinaus würde sich als zukünftiges Forschungsprojekt die Entdeckung neuartiger Sactipeptide anbieten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch *genomic mining* vier putative Sactipeptidbiosynthesegencluster identifiziert. Des Weiteren wurden Strukturvorschläge zu den vermutlich produzierten Peptiden gemacht. Diese könnten in weiterführenden Studien überprüft werden.

6. Literaturverzeichnis

- Aminake, M.N., Schoof, S., Sologub, L., Leubner, M., Kirschner, M., Arndt, H.-D., and Pradel, G. (2011). Thiostrepton and derivatives exhibit antimalarial and gametocytocidal activity by dually targeting parasite proteasome and apicoplast. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 1338–1348.
- Anborgh, P.H., and Parmeggiani, A. (1991). New antibiotic that acts specifically on the GTP-bound form of elongation factor Tu. *Embo J* **10**, 779–784.
- Anton, B.P., Russell, S.P., Vertrees, J., Kasif, S., Raleigh, E.A., Limbach, P.A., and Roberts, R.J. (2010). Functional characterization of the YmcB and YqeV tRNA methylthiotransferases of *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res* **38**, 6195–6205.
- Anton, B.P., Saleh, L., Benner, J.S., Raleigh, E.A., Kasif, S., and Roberts, R.J. (2008). RimO, a MiaB-like enzyme, methylthiolates the universally conserved Asp88 residue of ribosomal protein S12 in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 1826–1831.
- Aoki, M., Ohtsuka, T., Yamada, M., Ohba, Y., Yoshizaki, H., Yasuno, H., Sano, T., Watanabe, J., Yokose, K., and Seto, H. (1991). Cyclothiazomycin, a novel polythiazole-containing peptide with renin inhibitory activity. Taxonomy, fermentation, isolation and physico-chemical characterization. *J. Antibiot.* **44**, 582–588.
- Arnison, P.G., Bibb, M.J., Bierbaum, G., Bowers, A.A., Bugni, T.S., Bulaj, G., Camarero, J.A., Campopiano, D.J., Challis, G.L., Clardy, J., et al. (2012). Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Natural Product Reports* **30**, 108–160.
- Arragain, S., García-Serres, R., Blondin, G., Douki, T., Clemancey, M., Latour, J.-M., Forouhar, F., Neely, H., Montelione, G.T., Hunt, J.F., et al. (2010). Post-translational modification of ribosomal proteins: structural and functional characterization of RimO from *Thermotoga maritima*, a radical S-adenosylmethionine methylthiotransferase. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 5792–5801.
- Atta, M., Mulliez, E., Arragain, S., Forouhar, F., Hunt, J.F., and Fontecave, M. (2010). ScienceDirect - Current Opinion in Structural Biology : S-Adenosylmethionine-dependent radical-based modification of biological macromolecules. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **20**, 684–692.
- Babasaki, K., Takao, T., Shimonishi, Y., and Kurahashi, K. (1985). Subtilisin A, a new antibiotic peptide produced by *Bacillus subtilis* 168: isolation, structural analysis, and biogenesis. *J Biochem* **98**, 585–603.
- Bagley, M.C., Dale, J.W., Merritt, E.A., and Xiong, X. (2005). Thiopeptide antibiotics. *Chem Rev* **105**, 685–714.
- Banerjee, S., and Hansen, J.N. (1988). Structure and expression of a gene encoding the precursor of subtilin, a small protein antibiotic. *J. Biol. Chem.* **263**, 9508–9514.
- Bastos, M.C.F., Ceotto, H., Coelho, M.L.V., and Nascimento, J.S. (2009). Staphylococcal antimicrobial peptides: relevant properties and potential biotechnological applications. *Curr Pharm Biotechnol* **10**, 38–61.
- Benjdia, A., Heil, K., Barends, T.R.M., Carell, T., and Schlichting, I. (2012). Structural insights into recognition and repair of UV-DNA damage by Spore Photoproduct Lyase, a radical SAM enzyme. *Nucleic Acids Res* **40**, 9308–9318.

- Benjdia, A., Leprince, J., Guillot, A., Vaudry, H., Rabot, S., and Berteau, O. (2007). Anaerobic sulfatase-maturing enzymes: radical SAM enzymes able to catalyze in vitro sulfatase post-translational modification. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 3462–3463.
- Bennett, J., and Scott, K.J. (1971). Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue. *Anal. Biochem.* **43**, 173–182.
- Berkovitch, F. (2004). Crystal Structure of Biotin Synthase, an S-Adenosylmethionine-Dependent Radical Enzyme. *Science* **303**, 76–79.
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **62**, 293–300.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513–1523.
- Boal, A.K., Grove, T.L., McLaughlin, M.I., Yennawar, N.H., Booker, S.J., and Rosenzweig, A.C. (2011). Structural basis for methyl transfer by a radical SAM enzyme. *Science* **332**, 1089–1092.
- Boltes, I., Czapinska, H., Kahnert, A., Bülow, von, R., Dierks, T., Schmidt, B., Figura, von, K., Kertesz, M.A., and Usón, I. (2001). 1.3 A structure of arylsulfatase from *Pseudomonas aeruginosa* establishes the catalytic mechanism of sulfate ester cleavage in the sulfatase family. *Structure* **9**, 483–491.
- Boß, L. (2012). Studien zur Biosynthese von Thuringin H. Philipps-Universität Marburg.
- Brazzolotto, X., Rubach, J.K., Gaillard, J., Gambarelli, S., Atta, M., and Fontecave, M. (2006). The [Fe-Fe]-hydrogenase maturation protein HydF from *Thermotoga maritima* is a GTPase with an iron-sulfur cluster. *J. Biol. Chem.* **281**, 769–774.
- Brodsgaard, C.J., Ritter, W., and Hansen, H. (1998). Response of in vitro reared honey bee larvae to various doses of *Paenibacillus* larvae spores. *Apidologie* **29**, 569–578.
- Buchman, G.W., Banerjee, S., and Hansen, J.N. (1988). Structure, expression, and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. *J. Biol. Chem.* **263**, 16260–16266.
- Bycroft, B.W., and Gowland, M.S. (1978). The structures of the highly modified peptide antibiotics micrococcin P1 and P2. *Journal of the Chemical Society*.
- Chatterjee, A., Li, Y., Zhang, Y., Grove, T.L., Lee, M., Krebs, C., Booker, S.J., Begley, T.P., and Ealick, S.E. (2008). Reconstitution of ThiC in thiamine pyrimidine biosynthesis expands the radical SAM superfamily. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 758–765.
- Chatterjee, C., Miller, L.M., Leung, Y.L., Xie, L., Yi, M., Kelleher, N.L., and van der Donk, W.A. (2005). Lacticin 481 synthetase phosphorylates its substrate during lantibiotic production. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 15332–15333.
- Chirpich, T., Zappia, von, and Costilow, R. (1970). Lysine 2,3-Aminomutase. *J. Biol. Chem.* **245**, 1778–1789.
- Chiu, J., March, P.E., Lee, R., and Tillett, D. (2004). Site-directed, Ligase-Independent Mutagenesis (SLIM): a single-tube methodology approaching 100% efficiency in 4 h. *Nucleic Acids Res.* **32**, e174.

- Chiu, J., Tillett, D., Dawes, I.W., and March, P.E. (2008). Site-directed, Ligase-Independent Mutagenesis (SLIM) for highly efficient mutagenesis of plasmids greater than 8kb. *J. Microbiol. Methods* **73**, 195–198.
- Cicchillo, R.M., and Booker, S.J. (2005). Mechanistic investigations of lipoic acid biosynthesis in *Escherichia coli*: both sulfur atoms in lipoic acid are contributed by the same lipoyl synthase polypeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 2860–2861.
- Cicchillo, R.M., Iwig, D.F., Jones, A.D., Nesbitt, N.M., Baleanu-Gogonea, C., Souder, M.G., Tu, L., and Booker, S.J. (2004a). Lipoyl synthase requires two equivalents of S-adenosyl-L-methionine to synthesize one equivalent of lipoic acid. *Biochemistry* **43**, 6378–6386.
- Cicchillo, R.M., Lee, K.-H., Baleanu-Gogonea, C., Nesbitt, N.M., Krebs, C., and Booker, S.J. (2004b). *Escherichia coli* lipoyl synthase binds two distinct [4Fe-4S] clusters per polypeptide. *Biochemistry* **43**, 11770–11781.
- Claesen, J., and Bibb, M. (2010). Genome mining and genetic analysis of cypemycin biosynthesis reveal an unusual class of posttranslationally modified peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 16297–16302.
- Cosper, M.M., Jameson, G.N.L., Davydov, R., Eidsness, M.K., Hoffman, B.M., Huynh, B.H., and Johnson, M.K. (2002). The [4Fe-4S](2+) cluster in reconstituted biotin synthase binds S-adenosyl-L-methionine. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 14006–14007.
- Craig, A.G., Bandyopadhyay, P., and Olivera, B.M. (1999). Post-translationally modified neuropeptides from *Conus* venoms. *Eur. J. Biochem.* **264**, 271–275.
- Czech, I., Silakov, A., Lubitz, W., and Happe, T. (2010). The [FeFe]-hydrogenase maturase HydF from *Clostridium acetobutylicum* contains a CO and CN- ligated iron cofactor. *FEBS Lett.* **584**, 638–642.
- Delgado, M.A., Rintoul, M.R., Farías, R.N., and Salomón, R.A. (2001). *Escherichia coli* RNA polymerase is the target of the cyclopeptide antibiotic microcin J25. *J. Bacteriol.* **183**, 4543–4550.
- Demain, A.L. (2009). Antibiotics: natural products essential to human health. *Med Res Rev* **29**, 821–842.
- Demick, J.M., and Lanzilotta, W.N. (2011). Radical SAM activation of the B12-independent glycerol dehydratase results in formation of 5'-deoxy-5'-(methylthio)adenosine and not 5'-deoxyadenosine. *Biochemistry* **50**, 440–442.
- Ding, F.-X., Xian, X., Guo, Y.-J., Liu, Y., Wang, Y., Yang, F., Wang, Y.-Z., Song, S.-X., Wang, F., and Sun, S.-H. (2010). A preliminary study on the activation and antigen presentation of hepatitis B virus core protein virus-like particle-pulsed bone marrow-derived dendritic cells. *Mol Biosyst* **6**, 2192–2199.
- Donia, M.S., and Schmidt, E.W. (2011). Linking chemistry and genetics in the growing cyanobactin natural products family. *Chemistry & Biology* **18**, 508–519.
- Douglas, P., Kriek, M., Bryant, P., and Roach, P.L. (2006). Lipoyl synthase inserts sulfur atoms into an octanoyl substrate in a stepwise manner. *Angew Chem Int Ed Engl* **45**, 5197–5199.
- Driesener, R.C., Challand, M.R., McGlynn, S.E., Shepard, E.M., Boyd, E.S., Broderick, J.B., Peters, J.W., and Roach, P.L. (2010). [FeFe]-hydrogenase cyanide ligands derived from S-adenosylmethionine-dependent cleavage of tyrosine. *Angew Chem Int Ed Engl* **49**, 1687–1690.

- Duquesne, S., Petit, V., Peduzzi, J., and Rebuffat, S. (2007). Structural and functional diversity of microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **13**, 200–209.
- Duschene, K.S., and Broderick, J.B. (2010). The antiviral protein viperin is a radical SAM enzyme. *FEBS Lett.* **584**, 1263–1267.
- Duschene, K.S., Veneziano, S.E., Silver, S.C., and Broderick, J.B. (2009). Control of radical chemistry in the AdoMet radical enzymes. *Curr Opin Chem Biol* **13**, 74–83.
- Eklund, H., and Fontecave, M. (1999). Glycyl radical enzymes: a conservative structural basis for radicals. *Structure* **7**, R257–R262.
- Engelberg-Kulka, H., and Hazan, R. (2003). Microbiology. Cannibals defy starvation and avoid sporulation. *Science* **301**, 467–468.
- Engelhardt, K., Degnes, K.F., and Zotchev, S.B. (2010). Isolation and characterization of the gene cluster for biosynthesis of the thiopeptide antibiotic TP-1161. *Appl Environ Microbiol* **76**, 7093–7101.
- Fang, Q., Peng, J., and Dierks, T. (2004). Post-translational formylglycine modification of bacterial sulfatases by the radical S-adenosylmethionine protein AtsB. *J. Biol. Chem.* **279**, 14570–14578.
- Fish, W.W. (1988). Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples. *Meth. Enzymol.* **158**, 357–364.
- Fleming, A. (1980). Classics in infectious diseases: on the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae* by Alexander Fleming, Reprinted from the British Journal of Experimental Pathology 10:226-236, 1929.
- Flühe, L. (2010). Untersuchung der putativen Radical SAM Enzyme AlbA und SkfB (Philipps-Universität Marburg).
- Flühe, L., Knappe, T.A., Gattner, M.J., Schäfer, A., Burghaus, O., Linne, U., and Marahiel, M.A. (2012). The radical SAM enzyme AlbA catalyzes thioether bond formation in subtilisin A. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 350–357.
- Forouhar, F., Arragain, S., Atta, M., Gambarelli, S., Mouesca, J.-M., Hussain, M., Xiao, R., Kiefer-Jaquinod, S., Seetharaman, J., Acton, T.B., et al. (2013). Two Fe-S clusters catalyze sulfur insertion by radical-SAM methylthiotransferases. *Nat. Chem. Biol.*
- Freeman, M.F., Gurgui, C., Helf, M.J., Morinaka, B.I., Uria, A.R., Oldham, N.J., Sahl, H.-G., Matsunaga, S., and Piel, J. (2012). Metagenome mining reveals polytheonamides as posttranslationally modified ribosomal peptides. *Science* **338**, 387–390.
- Frey, P.A. (1993). Lysine 2,3-aminomutase: is adenosylmethionine a poor man's adenosylcobalamin? *Faseb J.* **7**, 662–670.
- Frey, P.A., Hegeman, A.D., and Ruzicka, F.J. (2008). The Radical SAM Superfamily. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **43**, 63–88.
- Fugate, C.J., Stich, T.A., Kim, E.G., Myers, W.K., Britt, R.D., and Jarrett, J.T. (2012). 9-Mercaptodethiobiotin is generated as a ligand to the [2Fe-2S]⁺ cluster during the reaction catalyzed by biotin synthase from *Escherichia coli*. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 9042–9045.

- Gattner, M.J. (2010). Studien zur Biosynthese des Bacteriocins Subtilosin A aus *Bacillus subtilis* 168. Philipps-Universität Marburg.
- Giessen, T.W., Tesmar, von, A.M., and Marahiel, M.A. (2013a). A tRNA-dependent two-enzyme pathway for the generation of singly and doubly methylated ditryptophan 2,5-diketopiperazines. *Biochemistry* 52, 4274–4283.
- Giessen, T.W., Tesmar, von, A.M., and Marahiel, M.A. (2013b). Insights into the generation of structural diversity in a tRNA-dependent pathway for highly modified bioactive cyclic dipeptides. *Chemistry & Biology* 20, 828–838.
- Gondry, M., Sauguet, L., Belin, P., Thai, R., Amouroux, R., Tellier, C., Tuphile, K., Jacquet, M., Braud, S., Courçon, M., et al. (2009). Cyclodipeptide synthases are a family of tRNA-dependent peptide bond-forming enzymes. *Nat. Chem. Biol.* 5, 414–420.
- González-Pastor, J.E., Hobbs, E.C., and Losick, R. (2003). Cannibalism by sporulating bacteria. *Science* 301, 510–513.
- Goodwin, P.M., and Anthony, C. (1998). The biochemistry, physiology and genetics of PQQ and PQQ-containing enzymes. *Adv. Microb. Physiol.* 40, 1–80.
- Goto, Y., Li, B., Claesen, J., Shi, Y., Bibb, M.J., and van der Donk, W.A. (2010). Discovery of unique lanthionine synthetases reveals new mechanistic and evolutionary insights. *PLoS Biol.* 8, e1000339.
- Goto, Y., Okesli, A., and van der Donk, W.A. (2011). Mechanistic studies of Ser/Thr dehydration catalyzed by a member of the LanL lanthionine synthetase family. *Biochemistry* 50, 891–898.
- Gross, E., and Morell, J.L. (1971). The structure of nisin. *J. Am. Chem. Soc.* 93, 4634–4635.
- Grove, T.L., Ahlum, J.H., Sharma, P., Krebs, C., and Booker, S.J. (2010). A consensus mechanism for Radical SAM-dependent dehydrogenation? BtrN contains two [4Fe-4S] clusters. *Biochemistry* 49, 3783–3785.
- Grove, T.L., Lee, K.-H., St Clair, J., Krebs, C., and Booker, S.J. (2008). In vitro characterization of AtsB, a radical SAM formylglycine-generating enzyme that contains three [4Fe-4S] clusters. *Biochemistry* 47, 7523–7538.
- Haft, D.H., and Basu, M.K. (2011). Biological systems discovery in silico: radical s-adenosylmethionine protein families and their target peptides for posttranslational modification. *J Bacteriol* 193, 2745–2755.
- Hagen, K., and Watson, A. (1983). Synthetic routes to iron sulfide (Fe₂S₂, Fe₃S₄, Fe₄S₄, and Fe₆S₉), clusters from the common precursor tetrakis(ethanethiolate)ferrate(2-) ion ([Fe(SC₂H₅)₄]²⁻): structures and properties of [Fe₃S₄(SR)₄]³⁻ and bis(ethanethiolate)nonathioxohexaferate(4-) ion ([Fe₆S₉(SC₂H₅)₂]⁴⁻), examples of the newest types of Fe-S-SR clusters. *J. Am. Chem. Soc.* 105, 3905–3913.
- Hamada, T., Sugawara, T., Matsunaga, S., and Fusetani, N. (1994). Polytheonamides, unprecedented highly cytotoxic polypeptides, from the marine sponge theonella swinhoei: 1. Isolation and component amino acids. *Tetrahedron Letters*.
- Hamada, T., Matsunaga, S., Yano, G., and Fusetani, N. (2005). Polytheonamides A and B, highly cytotoxic, linear polypeptides with unprecedented structural features, from the marine sponge, Theonella swinhoei. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 110–118.

- Hastings, J.W., Sailer, M., Johnson, K., Roy, K.L., Vederas, J.C., and Stiles, M.E. (1991). Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *J Bacteriol* *173*, 7491–7500.
- Hänzelmann, P., and Schindelin, H. (2004). Crystal structure of the S-adenosylmethionine-dependent enzyme MoaA and its implications for molybdenum cofactor deficiency in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* *101*, 12870–12875.
- Hänzelmann, P., and Schindelin, H. (2006). Binding of 5'-GTP to the C-terminal FeS cluster of the radical S-adenosylmethionine enzyme MoaA provides insights into its mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* *103*, 6829–6834.
- Hänzelmann, P., Hernández, H.L., Menzel, C., García-Serres, R., Huynh, B.H., Johnson, M.K., Mendel, R.R., and Schindelin, H. (2004). Characterization of MOCS1A, an oxygen-sensitive iron-sulfur protein involved in human molybdenum cofactor biosynthesis. *J. Biol. Chem.* *279*, 34721–34732.
- Heffron, S.E., and Jurnak, F. (2000). Structure of an EF-Tu complex with a thiazolyl peptide antibiotic determined at 2.35 Å resolution: atomic basis for GE2270A inhibition of EF-Tu. *Biochemistry* *39*, 37–45.
- Helfrich, M., Entian, K.-D., and Stein, T. (2007). Structure-function relationships of the lanthionine cyclase SpaC involved in biosynthesis of the *Bacillus subtilis* peptide antibiotic subtilin. *Biochemistry* *46*, 3224–3233.
- Helynck, G., Dubertret, C., Mayaux, J.F., and Leboul, J. (1993). Isolation of RP 71955, a new anti-HIV-1 peptide secondary metabolite. *J. Antibiot.* *46*, 1756–1757.
- Hemsley, A., Arnheim, N., Toney, M.D., Cortopassi, G., and Galas, D.J. (1989). A simple method for site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* *17*, 6545–6551.
- Hensens, O.D., and Albers-Schönberg, G. (1978). Total structure of the peptide antibiotic components of thiopeptin by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. *Tetrahedron Letters*.
- Henshaw, T.F., Cheek, J., and Broderick, J.B. (2000). The $[4\text{Fe-4S}]^+$ cluster of pyruvate formate-lyase activating enzyme generates the glycyl radical on pyruvate formate-lyase: EPR-detected single turnover. *Journal of the American ...* *122*, 8331–8332.
- Hernández, H.L., Pierrel, F., Elleingand, E., García-Serres, R., Huynh, B.H., Johnson, M.K., Fontecave, M., and Atta, M. (2007). MiaB, a bifunctional radical-S-adenosylmethionine enzyme involved in the thiolation and methylation of tRNA, contains two essential $[4\text{Fe-4S}]$ clusters. *Biochemistry* *46*, 5140–5147.
- Hinckley, G.T., and Frey, P.A. (2006). Cofactor dependence of reduction potentials for $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$ in lysine 2,3-aminomutase. *Biochemistry* *45*, 3219–3225.
- Huang, T., Geng, H., Miyapuram, V.R., Sit, C.S., Vederas, J.C., and Nakano, M.M. (2009). Isolation of a variant of subtilisin A with hemolytic activity. *J Bacteriol* *191*, 5690–5696.
- Ingram, L. (1970). A ribosomal mechanism for synthesis of peptides related to nisin. *Biochim. Biophys. Acta* *224*, 263–265.
- Jameson, G.N.L., Cosper, M.M., Hernández, H.L., Johnson, M.K., and Huynh, B.H. (2004). Role of the $[2\text{Fe-2S}]$ Cluster in Recombinant *Escherichia coli* Biotin Synthase †. *Biochemistry* *43*,

2022–2031.

Kaletta, C., Entian, K.D., Kellner, R., Jung, G., Reis, M., and Sahl, H.G. (1989). Pep5, a new lantibiotic: structural gene isolation and prepeptide sequence. *Arch. Microbiol.* **152**, 16–19.

Kapust, R.B., Tözsér, J., Fox, J.D., Anderson, D.E., Cherry, S., Copeland, T.D., and Waugh, D.S. (2001). Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency. *Protein Eng.* **14**, 993–1000.

Karakas Sen, A., Narbad, A., Horn, N., Dodd, H.M., Parr, A.J., Colquhoun, I., and Gasson, M.J. (1999). Post-translational modification of nisin. The involvement of NisB in the dehydration process. *Eur. J. Biochem.* **261**, 524–532.

Kasahara, T., and Kato, T. (2003). Nutritional biochemistry: A new redox-cofactor vitamin for mammals. *Nature* **422**, 832.

Kawulka, K.E., Sprules, T., Diaper, C.M., Whittall, R.M., McKay, R.T., Mercier, P., Zuber, P., and Vederas, J.C. (2004). Structure of subtilisin A, a cyclic antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* with unusual sulfur to alpha-carbon cross-links: formation and reduction of alpha-thio-alpha-amino acid derivatives. *Biochemistry* **43**, 3385–3395.

Kawulka, K.E., Sprules, T., McKay, R.T., Mercier, P., Diaper, C.M., Zuber, P., and Vederas, J.C. (2003). Structure of subtilisin A, an antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* with unusual posttranslational modifications linking cysteine sulfurs to alpha-carbons of phenylalanine and threonine. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 4726–4727.

Keil, B. (1992). *Specificity of Proteolysis* (Berlin - Heidelberg - New York: Springer Verlag).

Kelly, W.L., Pan, L., and Li, C. (2009). Thiostrepton biosynthesis: prototype for a new family of bacteriocins. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 4327–4334.

Kempter, C., Kupke, T., Kaiser, D., and Metzger, J.W. (1996). Thioenole aus Peptidyl-Cysteinen: oxidative Decarboxylierung eines ¹³C-markierten Substrats. *Angewandte*

Kim, L., Mogk, A., and Schumann, W. (1996). A xylose-inducible *Bacillus subtilis* integration vector and its application. *Gene* **181**, 71–76.

Klaenhammer, T.R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* **70**, 337–349.

Klein, C., Kaletta, C., Schnell, N., and Entian, K.D. (1992). Analysis of genes involved in biosynthesis of the lantibiotic subtilin. *Appl Environ Microbiol* **58**, 132–142.

Klinman, J.P. (2001). How many ways to craft a cofactor? *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 14766–14768.

Klusken, L.D., Kuipers, A., Rink, R., de Boef, E., Fekken, S., Driessen, A.J.M., Kuipers, O.P., and Moll, G.N. (2005). Post-translational modification of therapeutic peptides by NisB, the dehydratase of the lantibiotic nisin. *Biochemistry* **44**, 12827–12834.

Knappe, T.A., Linne, U., Robbel, L., and Marahiel, M.A. (2009). Insights into the biosynthesis and stability of the lasso peptide capistrin. *Chemistry & Biology* **16**, 1290–1298.

Knappe, T.A., Linne, U., Xie, X., and Marahiel, M.A. (2010). The glucagon receptor antagonist BI-32169 constitutes a new class of lasso peptides. *FEBS Lett.* **584**, 785–789.

- Knappe, T.A., Linne, U., Zirah, S., Rebuffat, S., Xie, X., and Marahiel, M.A. (2008). Isolation and structural characterization of capistruin, a lasso peptide predicted from the genome sequence of *Burkholderia thailandensis* E264. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 11446–11454.
- Knappe, T.A., Manzenrieder, F., Mas-Moruno, C., Linne, U., Sasse, F., Kessler, H., Xie, X., and Marahiel, M.A. (2011). Introducing lasso peptides as molecular scaffolds for drug design: engineering of an integrin antagonist. *Angew Chem Int Ed Engl* **50**, 8714–8717.
- Knerr, P.J., and van der Donk, W.A. (2012). Discovery, biosynthesis, and engineering of lantipeptides. *Annu Rev Biochem* **81**, 479–505.
- Kodani, S., Hudson, M.E., Durrant, M.C., Buttner, M.J., Nodwell, J.R., and Willey, J.M. (2004). The SapB morphogen is a lantibiotic-like peptide derived from the product of the developmental gene *ramS* in *Streptomyces coelicolor*. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 11448–11453.
- Koehnke, J., Bent, A., Houssen, W.E., Zollman, D., Morawitz, F., Shirran, S., Vendome, J., Nneoyiegbe, A.F., Trembleau, L., Botting, C.H., et al. (2012). The mechanism of patellamide macrocyclization revealed by the characterization of the PatG macrocyclase domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 767–772.
- Koponen, O., Tolonen, M., Qiao, M., Wahlström, G., Helin, J., and Saris, P.E.J. (2002). NisB is required for the dehydration and NisC for the lanthionine formation in the post-translational modification of nisin. *Microbiology (Reading, Engl.)* **148**, 3561–3568.
- Kuznedelov, K., Semenova, E., Knappe, T.A., Mukhamedyarov, D., Srivastava, A., Chatterjee, S., Ebright, R.H., Marahiel, M.A., and Severinov, K. (2011). The antibacterial threaded-lasso peptide capistruin inhibits bacterial RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **412**, 842–848.
- Külzer, R., Pils, T., Kappl, R., Hüttermann, J., and Knappe, J. (1998). Reconstitution and characterization of the polynuclear iron-sulfur cluster in pyruvate formate-lyase-activating enzyme. Molecular properties of the holoenzyme form. *J. Biol. Chem.* **273**, 4897–4903.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- LaVallie, E.R., DiBlasio, E.A., Kovacic, S., Grant, K.L., Schendel, P.F., and McCoy, J.M. (1993). A Thioredoxin Gene Fusion Expression System That Circumvents Inclusion Body Formation in the *E. coli* Cytoplasm. *Nat Biotechnol* **11**, 187–193.
- Layer, G., Kervio, E., Morlock, G., Heinz, D.W., Jahn, D., Retey, J., and Schubert, W.-D. (2005). Structural and functional comparison of HemN to other radical SAM enzymes. *Biol. Chem.* **386**, 971–980.
- Lee, H., Churey, J.J., and Worobo, R.W. (2009a). Biosynthesis and transcriptional analysis of thurincin H, a tandem repeated bacteriocin genetic locus, produced by *Bacillus thuringiensis* SF361. *FEMS Microbiol Lett* **299**, 205–213.
- Lee, K.-H., Saleh, L., Anton, B.P., Madinger, C.L., Benner, J.S., Iwig, D.F., Roberts, R.J., Krebs, C., and Booker, S.J. (2009b). Characterization of RimO, a new member of the methylthiotransferase subclass of the radical SAM superfamily. *Biochemistry* **48**, 10162–10174.
- Lentzen, G., Klinck, R., Matassova, N., Aboul-ela, F., and Murchie, A.I.H. (2003). Structural basis for contrasting activities of ribosome binding thiazole antibiotics. *Chemistry & Biology* **10**, 769–778.

- Lepore, B.W., Ruzicka, F.J., Frey, P.A., and Ringe, D. (2005). The x-ray crystal structure of lysine-2,3-aminomutase from *Clostridium subterminale*. *Proc Natl Acad Sci USA* *102*, 13819–13824.
- Leuthner, B., Leutwein, C., Schulz, H., Hörth, P., Haehnel, W., Schiltz, E., Schägger, H., and Heider, J. (1998). Biochemical and genetic characterization of benzylsuccinate synthase from *Thauera aromatica*: a new glycyl radical enzyme catalysing the first step in anaerobic toluene metabolism. *Mol. Microbiol.* *28*, 615–628.
- Levengood, M.R., Knerr, P.J., Oman, T.J., and van der Donk, W.A. (2009). In vitro mutasynthesis of lantibiotic analogues containing nonproteinogenic amino acids. *J. Am. Chem. Soc.* *131*, 12024–12025.
- Levengood, M.R., Patton, G.C., and van der Donk, W.A. (2007). The leader peptide is not required for post-translational modification by lactacin 481 synthetase. *J. Am. Chem. Soc.* *129*, 10314–10315.
- Li, B., Yu, J.P.J., Brunzelle, J.S., Moll, G.N., van der Donk, W.A., and Nair, S.K. (2006). Structure and mechanism of the lantibiotic cyclase involved in nisin biosynthesis. *Science* *311*, 1464–1467.
- Li, L., and Marsh, E.N.G. (2006a). Deuterium isotope effects in the unusual addition of toluene to fumarate catalyzed by benzylsuccinate synthase. *Biochemistry* *45*, 13932–13938.
- Li, L., and Marsh, E.N.G. (2006b). Mechanism of benzylsuccinate synthase probed by substrate and isotope exchange. *J. Am. Chem. Soc.* *128*, 16056–16057.
- Liao, R., Duan, L., Lei, C., Pan, H., Ding, Y., Zhang, Q., Chen, D., Shen, B., Yu, Y., and Liu, W. (2009). Thiopeptide biosynthesis featuring ribosomally synthesized precursor peptides and conserved posttranslational modifications. *Chemistry & Biology* *16*, 141–147.
- Lin, P.F., Samanta, H., Bechtold, C.M., Deminie, C.A., Patick, A.K., Alam, M., Riccardi, K., Rose, R.E., White, R.J., and Colonno, R.J. (1996). Characterization of siamycin I, a human immunodeficiency virus fusion inhibitor. *Antimicrob. Agents Chemother.* *40*, 133–138.
- Liu, W.-T., Yang, Y.-L., Xu, Y., Lamsa, A., Haste, N.M., Yang, J.Y., Ng, J., Gonzalez, D., Ellermeyer, C.D., Straight, P.D., et al. (2010). Imaging mass spectrometry of intraspecies metabolic exchange revealed the cannibalistic factors of *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* *107*, 16286–16290.
- Lubelski, J., Rink, R., Khusainov, R., Moll, G.N., and Kuipers, O.P. (2008). Biosynthesis, immunity, regulation, mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* *65*, 455–476.
- Lukatela, G., Krauss, N., Theis, K., Selmer, T., Gieselmann, V., Figura, von, K., and Saenger, W. (1998). Crystal structure of human arylsulfatase A: the aldehyde function and the metal ion at the active site suggest a novel mechanism for sulfate ester hydrolysis. *Biochemistry* *37*, 3654–3664.
- Maksimov, M.O., Pan, S.J., and James Link, A. (2012). Lasso peptides: structure, function, biosynthesis, and engineering. *Natural Product Reports* *29*, 996–1006.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Laboratory Press.

- Maqueda, M., Sánchez-Hidalgo, M., Fernández, M., Montalbán-López, M., Valdivia, E., and Martínez-Bueno, M. (2008). Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 32, 2–22.
- Marahiel, M.A. (2009). Working outside the protein-synthesis rules: insights into non-ribosomal peptide synthesis. *J. Pept. Sci.* 15, 799–807.
- Marahiel, M.A., Stachelhaus, T., and Mootz, H.D. (1997). Modular Peptide Synthetases Involved in Nonribosomal Peptide Synthesis. *Chem Rev* 97, 2651–2674.
- Marquardt, C., Fang, Q., Will, E., Peng, J., Figura, von, K., and Dierks, T. (2003). Posttranslational modification of serine to formylglycine in bacterial sulfatases. Recognition of the modification motif by the iron-sulfur protein AtsB. *J. Biol. Chem.* 278, 2212–2218.
- Marx, R., Stein, T., Entian, K.D., and Glaser, S.J. (2001). Structure of the *Bacillus subtilis* peptide antibiotic subtilisin A determined by 1H-NMR and matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Protein Chem* 20, 501–506.
- McConkey, G.A., Rogers, M.J., and McCutchan, T.F. (1997). Inhibition of *Plasmodium falciparum* protein synthesis. Targeting the plastid-like organelle with thiostrepton. *J. Biol. Chem.* 272, 2046–2049.
- McGlynn, S.E., Shepard, E.M., Winslow, M.A., Naumov, A.V., Duschene, K.S., Posewitz, M.C., Broderick, W.E., Broderick, J.B., and Peters, J.W. (2008). HydF as a scaffold protein in [FeFe] hydrogenase H-cluster biosynthesis. *FEBS Lett.* 582, 2183–2187.
- McIntosh, J.A., Donia, M.S., and Schmidt, E.W. (2009). Ribosomal peptide natural products: bridging the ribosomal and nonribosomal worlds. *Natural Product Reports* 26, 537–559.
- McIntosh, J.A., Donia, M.S., Nair, S.K., and Schmidt, E.W. (2011). Enzymatic basis of ribosomal peptide prenylation in cyanobacteria. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 13698–13705.
- McIntosh, J.A., Robertson, C.R., Agarwal, V., Nair, S.K., Bulaj, G.W., and Schmidt, E.W. (2010). Circular logic: nonribosomal peptide-like macrocyclization with a ribosomal peptide catalyst. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 15499–15501.
- Mehta, A.P., Hanes, J.W., Abdelwahed, S.H., Hilmey, D.G., Hänzelmann, P., and Begley, T.P. (2013). Catalysis of a new ribose carbon-insertion reaction by the molybdenum cofactor biosynthetic enzyme MoaA. *Biochemistry*.
- Meindl, K., Schmiederer, T., Schneider, K., Reicke, A., Butz, D., Keller, S., Gühring, H., Vértessy, L., Wink, J., Hoffmann, H., et al. (2010). Labyrinthopeptins: a new class of carbacyclic lantibiotics. *Angew Chem Int Ed Engl* 49, 1151–1154.
- Meyer, C., Bierbaum, G., Heidrich, C., Reis, M., Söling, J., Iglesias-Wind, M.I., Kempter, C., Molitor, E., and Sahl, H.G. (1995). Nucleotide sequence of the lantibiotic Pep5 biosynthetic gene cluster and functional analysis of PepP and PepC. Evidence for a role of PepC in thioether formation. *Eur. J. Biochem.* 232, 478–489.
- Mikolajka, A., Liu, H., Chen, Y., Starosta, A.L., Márquez, V., Ivanova, M., Cooperman, B.S., and Wilson, D.N. (2011). Differential effects of thiopeptide and orthosomycin antibiotics on translational GTPases. *Chemistry & Biology* 18, 589–600.
- Miller, J.R., Busby, R.W., Jordan, S.W., Cheek, J., Henshaw, T.F., Ashley, G.W., Broderick, J.B., Cronan, J.E., and Marletta, M.A. (2000). *Escherichia coli* LipA is a lipoyl synthase: in vitro

biosynthesis of lipoylated pyruvate dehydrogenase complex from octanoyl-acyl carrier protein. *Biochemistry* **39**, 15166–15178.

Minami, Y., Yoshida, K., Azuma, R., and Urakawa, A. (1994). Structure of cypemycin, a new peptide antibiotic. *Tetrahedron Letters*.

Moll, G.N., Kuipers, A., and Rink, R. (2010). Microbial engineering of dehydro-amino acids and lanthionines in non-lantibiotic peptides. *Antonie Van Leeuwenhoek* **97**, 319–333.

Morris, R.P., Leeds, J.A., Naegeli, H.U., Oberer, L., Memmert, K., Weber, E., LaMarche, M.J., Parker, C.N., Burrer, N., Esterow, S., et al. (2009). Ribosomally synthesized thiopeptide antibiotics targeting elongation factor Tu. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 5946–5955.

Mulder, D.W., Boyd, E.S., Sarma, R., Lange, R.K., Endrizzi, J.A., Broderick, J.B., and Peters, J.W. (2010). Stepwise [FeFe]-hydrogenase H-cluster assembly revealed in the structure of HydA(DeltaEFG). *Nature* **465**, 248–251.

Mulliez, E., Padovani, D., Atta, M., Alcouffe, C., and Fontecave, M. (2001). Activation of class III ribonucleotide reductase by flavodoxin: a protein radical-driven electron transfer to the iron-sulfur center. *Biochemistry* **40**, 3730–3736.

Murphy, K., O'Sullivan, O., Rea, M.C., Cotter, P.D., Ross, R.P., and Hill, C. (2011). Genome Mining for Radical SAM Protein Determinants Reveals Multiple Sactibiotic-Like Gene Clusters. *PLoS ONE* **6**, e20852.

Müller, W.M., Schmiederer, T., Ensle, P., and Süssmuth, R.D. (2010). In vitro biosynthesis of the prepeptide of type-III lantibiotic labyrinthopeptin A2 including formation of a C-C bond as a post-translational modification. *Angew Chem Int Ed Engl* **49**, 2436–2440.

Nes, I.F., Diep, D.B., and Holo, H. (2007). Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Bacteriol* **189**, 1189–1198.

Newman, D.J., and Cragg, G.M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* **70**, 461–477.

Newman, D.J., Cragg, G.M., and Snader, K.M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* **66**, 1022–1037.

Nicolet, Y., Martin, L., Tron, C., and Fontecilla-Camps, J.C. (2010). A glycyI free radical as the precursor in the synthesis of carbon monoxide and cyanide by the [FeFe]-hydrogenase maturase HydG. *FEBS Lett.* **584**, 4197–4202.

Oman, T.J., and van der Donk, W.A. (2009). Follow the leader: the use of leader peptides to guide natural product biosynthesis. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 9–18.

Oman, T.J., Knerr, P.J., Bindman, N.A., Velásquez, J.E., and van der Donk, W.A. (2012). An engineered lantibiotic synthetase that does not require a leader peptide on its substrate. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 6952–6955.

Pan, S.J., Rajniak, J., Cheung, W.L., and Link, A.J. (2012). Construction of a single polypeptide that matures and exports the lasso peptide microcin J25. *Chembiochem* **13**, 367–370.

Parmeggiani, A., Krab, I.M., Okamura, S., Nielsen, R.C., Nyborg, J., and Nissen, P. (2006). Structural basis of the action of pulvomycin and GE2270 A on elongation factor Tu. *Biochemistry* **45**, 6846–6857.

- Peters, J.W., Lanzilotta, W.N., Lemon, B.J., and Seefeldt, L.C. (1998). X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (Cpl) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 angstrom resolution. *Science* **282**, 1853–1858.
- Pierrel, F., Douki, T., Fontecave, M., and Atta, M. (2004). MiaB protein is a bifunctional radical-S-adenosylmethionine enzyme involved in thiolation and methylation of tRNA. *J. Biol. Chem.* **279**, 47555–47563.
- Pierrel, F., Hernández, H.L., Johnson, M.K., Fontecave, M., and Atta, M. (2003). MiaB protein from *Thermotoga maritima*. Characterization of an extremely thermophilic tRNA-methylthiotransferase. *J. Biol. Chem.* **278**, 29515–29524.
- Piggot, P.J., and Hilbert, D.W. (2004). Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology* **7**, 579–586.
- Porse, B.T., Cundliffe, E., and Garrett, R.A. (1999). The antibiotic micrococcin acts on protein L11 at the ribosomal GTPase centre. *J. Mol. Biol.* **287**, 33–45.
- Porse, B.T., Leviev, I., Mankin, A.S., and Garrett, R.A. (1998). The antibiotic thiostrepton inhibits a functional transition within protein L11 at the ribosomal GTPase centre. *J. Mol. Biol.* **276**, 391–404.
- Posewitz, M.C., King, P.W., Smolinski, S.L., Zhang, L., Seibert, M., and Ghirardi, M.L. (2004). Discovery of two novel radical S-adenosylmethionine proteins required for the assembly of an active [Fe] hydrogenase. *J. Biol. Chem.* **279**, 25711–25720.
- Puehringer, S., Metlitzky, M., and Schwarzenbacher, R. (2008). The pyrroloquinoline quinone biosynthesis pathway revisited: a structural approach. *BMC Biochem.* **9**, 8.
- Qin, X., Evans, J.D., Aronstein, K.A., Murray, K.D., and Weinstock, G.M. (2006). Genome sequences of the honey bee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*. *Insect Mol Biol* **15**, 715–718.
- Rea, M.C., Sit, C.S., Clayton, E., O'Connor, P.M., Whittall, R.M., Zheng, J., Vederas, J.C., Ross, R.P., and Hill, C. (2010). Thuricin CD, a posttranslationally modified bacteriocin with a narrow spectrum of activity against *Clostridium difficile*. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 9352–9357.
- Reiss, J. (2000). Genetics of molybdenum cofactor deficiency. *Hum. Genet.* **106**, 157–163.
- Reiss, J., and Johnson, J.L. (2003). Mutations in the molybdenum cofactor biosynthetic genes MOCS1, MOCS2, and GEPH. *Hum. Mutat.* **21**, 569–576.
- Rodnina, M.V., Savelsbergh, A., Matassova, N.B., Katunin, V.I., Semenov, Y.P., and Wintermeyer, W. (1999). Thiostrepton inhibits the turnover but not the GTPase of elongation factor G on the ribosome. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 9586–9590.
- Rodríguez, J.M., Martínez, M.I., and Kok, J. (2002). Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Crit Rev Food Sci Nutr* **42**, 91–121.
- Rogers, L.A., and Whittier, E.O. (1928). LIMITING FACTORS IN THE LACTIC FERMENTATION. *J Bacteriol* **16**, 211–229.
- Rogers, M.J., Cundliffe, E., and McCutchan, T.F. (1998). The antibiotic micrococcin is a potent inhibitor of growth and protein synthesis in the malaria parasite. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 715–716.

- Rubach, J.K., Brazzolotto, X., Gaillard, J., and Fontecave, M. (2005). Biochemical characterization of the HydE and HydG iron-only hydrogenase maturation enzymes from *Thermatoga maritima*. *FEBS Lett.* **579**, 5055–5060.
- Salomón, R.A., and Farías, R.N. (1992). Microcin 25, a novel antimicrobial peptide produced by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**, 7428–7435.
- Sattely, E.S., Fischbach, M.A., and Walsh, C.T. (2008). Total biosynthesis: in vitro reconstitution of polyketide and nonribosomal peptide pathways. *Natural Product Reports* **25**, 757–793.
- Schmidt, E.W., Nelson, J.T., Rasko, D.A., Sudek, S., Eisen, J.A., Haygood, M.G., and Ravel, J. (2005). Patellamide A and C biosynthesis by a microcin-like pathway in *Prochloron didemni*, the cyanobacterial symbiont of *Lissoclinum patella*. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 7315–7320.
- Schnell, N., Entian, K.D., Schneider, U., Götz, F., Zähner, H., Kellner, R., and Jung, G. (1988). Prepeptide sequence of epidermin, a ribosomally synthesized antibiotic with four sulphide-rings. *Nature* **333**, 276–278.
- Schoof, S., Pradel, G., Aminake, M.N., Ellinger, B., Baumann, S., Potowski, M., Najajreh, Y., Kirschner, M., and Arndt, H.-D. (2010). Antiplasmodial thiostrepton derivatives: proteasome inhibitors with a dual mode of action. *Angew Chem Int Ed Engl* **49**, 3317–3321.
- Selmer, T., Pierik, A.J., and Heider, J. (2005). New glycyl radical enzymes catalysing key metabolic steps in anaerobic bacteria. *Biol. Chem.* **386**, 981–988.
- Shelburne, C.E., An, F.Y., Dholpe, V., Ramamoorthy, A., Lopatin, D.E., and Lantz, M.S. (2007). The spectrum of antimicrobial activity of the bacteriocin subtilisin A. *J Antimicrob Chemother* **59**, 297–300.
- Shepard, E.M., Duffus, B.R., George, S.J., McGlynn, S.E., Challand, M.R., Swanson, K.D., Roach, P.L., Cramer, S.P., Peters, J.W., and Broderick, J.B. (2010). [FeFe]-hydrogenase maturation: HydG-catalyzed synthesis of carbon monoxide. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 9247–9249.
- Siegel, L.M. (1965). A direct microdetermination for sulfide. *Anal. Biochem.* **11**, 126–132.
- Siegers, K., Heinzmann, S., and Entian, K.D. (1996). Biosynthesis of lantibiotic nisin. Posttranslational modification of its prepeptide occurs at a multimeric membrane-associated lanthionine synthetase complex. *J. Biol. Chem.* **271**, 12294–12301.
- Siezen, R.J., Kuipers, O.P., and de Vos, W.M. (1996). Comparison of lantibiotic gene clusters and encoded proteins. *Antonie Van Leeuwenhoek* **69**, 171–184.
- Silkin, L., Hamza, S., Kaufman, S., Cobb, S.L., and Vederas, J.C. (2008). Spermicidal bacteriocins: lacticin 3147 and subtilisin A. *Bioorg Med Chem Lett* **18**, 3103–3106.
- Singh, S.B., and Barrett, J.F. (2006). Empirical antibacterial drug discovery--foundation in natural products. *Biochem. Pharmacol.* **71**, 1006–1015.
- Sit, C.S., McKay, R.T., Hill, C., Ross, R.P., and Vederas, J.C. (2011a). The 3D Structure of Thuricin CD, a Two-Component Bacteriocin with Cysteine Sulfur to α -Carbon Cross-links. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 7680–7683.
- Sit, C.S., van Belkum, M.J., McKay, R.T., Worobo, R.W., and Vederas, J.C. (2011b). The 3D Solution Structure of Thuricin H, a Bacteriocin with Four Sulfur to α -Carbon Crosslinks. *Angew Chem Int Ed Engl* **50**, 8718–8721.

- Sofia, H., Chen, G., Hetzler, B., Reyes-Spindola, J., and Miller, N. (2001). Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods. *Nucleic Acids Res* 29, 1097–1106.
- Starosta, A.L., Qin, H., Mikolajka, A., Leung, G.Y.C., Schwinghammer, K., Nicolaou, K.C., Chen, D.Y.-K., Cooperman, B.S., and Wilson, D.N. (2009). Identification of distinct thiopeptide-antibiotic precursor lead compounds using translation machinery assays. *Chemistry & Biology* 16, 1087–1096.
- Stoll, V.S., Manohar, A.V., Gillon, W., MacFarlane, E.L., Hynes, R.C., and Pai, E.F. (1998). A thioredoxin fusion protein of VanH, a D-lactate dehydrogenase from *Enterococcus faecium*: cloning, expression, purification, kinetic analysis, and crystallization. *Protein Sci.* 7, 1147–1155.
- Stragier, P., Bonamy, C., and Karmazyn-Campelli, C. (1988). Processing of a sporulation sigma factor in *Bacillus subtilis*: how morphological structure could control gene expression. *Cell* 52, 697–704.
- Strieker, M., Tanović, A., and Marahiel, M.A. (2010). Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 20, 234–240.
- SU, T.L. (1948). Micrococcin, an antibacterial substance formed by a strain of *Micrococcus*. *Br J Exp Pathol* 29, 473–481.
- Sutyak, K.E., Wirawan, R.E., Aroutcheva, A.A., and Chikindas, M.L. (2008a). Isolation of the *Bacillus subtilis* antimicrobial peptide subtilisin from the dairy product-derived *Bacillus amyloliquefaciens*. *J Appl Microbiol* 104, 1067–1074.
- Sutyak, K.E., Anderson, R.A., Dover, S.E., Feathergill, K.A., Aroutcheva, A.A., Faro, S., and Chikindas, M.L. (2008b). Spermicidal activity of the safe natural antimicrobial peptide subtilisin. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2008, 540758.
- Sweeney, W.V., and Rabinowitz, J.C. (1980). Proteins containing 4Fe-4S clusters: an overview. *Annu Rev Biochem* 49, 139–161.
- Szameit, C., Miech, C., Balleininger, M., Schmidt, B., Figura, von, K., and Dierks, T. (1999). The iron sulfur protein AtsB is required for posttranslational formation of formylglycine in the *Klebsiella* sulfatase. *J. Biol. Chem.* 274, 15375–15381.
- Taylor, A.M., Stoll, S., Britt, R.D., and Jarrett, J.T. (2011). Reduction of the [2Fe-2S] cluster accompanies formation of the intermediate 9-mercaptodethiobiotin in *Escherichia coli* biotin synthase. *Biochemistry* 50, 7953–7963.
- Thennarasu, S., Lee, D.-K., Poon, A., Kawulka, K.E., Vederas, J.C., and Ramamoorthy, A. (2005). Membrane permeabilization, orientation, and antimicrobial mechanism of subtilisin A. *Chem Phys Lipids* 137, 38–51.
- Tse Sum Bui, B., Mattioli, T.A., Florentin, D., Bolbach, G., and Marquet, A. (2006). *Escherichia coli* biotin synthase produces selenobiotin. Further evidence of the involvement of the [2Fe-2S]²⁺ cluster in the sulfur insertion step. *Biochemistry* 45, 3824–3834.
- Ugulava, N.B., Gibney, B.R., and Jarrett, J.T. (2000). Iron-sulfur cluster interconversions in biotin synthase: dissociation and reassociation of iron during conversion of [2Fe-2S] to [4Fe-4S] clusters. *Biochemistry* 39, 5206–5214.

- Ugulava, N.B., Gibney, B.R., and Jarrett, J.T. (2001a). Biotin synthase contains two distinct iron-sulfur cluster binding sites: chemical and spectroelectrochemical analysis of iron-sulfur cluster interconversions. *Biochemistry* 40, 8343–8351.
- Ugulava, N.B., Sacanell, C.J., and Jarrett, J.T. (2001b). Spectroscopic Changes during a Single Turnover of Biotin Synthase: Destruction of a [2Fe-2S] Cluster Accompanies Sulfur Insertion †. *Biochemistry* 40, 8352–8358.
- Verdine, G.L. (1996). The combinatorial chemistry of nature. *Nature* 384, 11–13.
- Wang, J., Yu, Y., Tang, K., Liu, W., He, X., Huang, X., and Deng, Z. (2010). Identification and analysis of the biosynthetic gene cluster encoding the thiopeptide antibiotic cyclothiazomycin in *Streptomyces hygroscopicus* 10-22. *Appl Environ Microbiol* 76, 2335–2344.
- Wang, S.C., and Frey, P.A. (2007). Binding energy in the one-electron reductive cleavage of S-adenosylmethionine in lysine 2,3-aminomutase, a radical SAM enzyme. *Biochemistry* 46, 12889–12895.
- Wecksler, S.R., Stoll, S., Iavarone, A.T., Imsand, E.M., Tran, H., Britt, R.D., and Klinman, J.P. (2010). Interaction of PqqE and PqqD in the pyrroloquinoline quinone (PQQ) biosynthetic pathway links PqqD to the radical SAM superfamily. *Chem. Commun. (Camb.)* 46, 7031–7033.
- Wecksler, S.R., Stoll, S., Tran, H., Magnusson, O.T., Wu, S.-P., King, D., Britt, R.D., and Klinman, J.P. (2009). Pyrroloquinoline quinone biogenesis: demonstration that PqqE from *Klebsiella pneumoniae* is a radical S-adenosyl-L-methionine enzyme. *Biochemistry* 48, 10151–10161.
- Weil, H.P., Beck-Sickinger, A.G., Metzger, J., Stevanovic, S., Jung, G., Josten, M., and Sahl, H.G. (1990). Biosynthesis of the lantibiotic Pep5. Isolation and characterization of a prepeptide containing dehydroamino acids. *Eur. J. Biochem.* 194, 217–223.
- Wieckowski, B.M. Studien zur Biosynthese von Thurincin H. Philipps-Universität Marburg.
- Wieland Brown, L.C., Acker, M.G., Clardy, J., Walsh, C.T., and Fischbach, M.A. (2009). Thirteen posttranslational modifications convert a 14-residue peptide into the antibiotic thiocillin. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 2549–2553.
- Wiig, J.A., Hu, Y., Lee, C.C., and Ribbe, M.W. (2012). Radical SAM-dependent carbon insertion into the nitrogenase M-cluster. *Science* 337, 1672–1675.
- Wilkinson, D.L., Ma, N.T., Haught, C., and Harrison, R.G. (1995). Purification by immobilized metal affinity chromatography of human atrial natriuretic peptide expressed in a novel thioredoxin fusion protein. *Biotechnol. Prog.* 11, 265–269.
- Xie, L., Miller, L.M., Chatterjee, C., Averin, O., Kelleher, N.L., and van der Donk, W.A. (2004). Lacticin 481: in vitro reconstitution of lantibiotic synthetase activity. *Science* 303, 679–681.
- Yan, K.-P., Li, Y., Zirah, S., Goulard, C., Knappe, T.A., Marahiel, M.A., and Rebuffat, S. (2012). Dissecting the maturation steps of the lasso peptide microcin J25 in vitro. *Chembiochem* 13, 1046–1052.
- Yano, K., Toki, S., Nakanishi, S., Ochiai, K., Ando, K., Yoshida, M., Matsuda, Y., and Yamasaki, M. (1996). MS-271, a novel inhibitor of calmodulin-activated myosin light chain kinase from *Streptomyces* sp.-I. Isolation, structural determination and biological properties of MS-271. *Bioorg. Med. Chem.* 4, 115–120.

Yokoyama, K., Numakura, M., Kudo, F., Ohmori, D., and Eguchi, T. (2007). Characterization and mechanistic study of a radical SAM dehydrogenase in the biosynthesis of butirosin. *J. Am. Chem. Soc.* *129*, 15147–15155.

Yokoyama, K., Ohmori, D., Kudo, F., and Eguchi, T. (2008). Mechanistic study on the reaction of a radical SAM dehydrogenase BtrN by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* *47*, 8950–8960.

Young, T.S., and Walsh, C.T. (2011). Identification of the thiazolyl peptide GE37468 gene cluster from *Streptomyces* ATCC 55365 and heterologous expression in *Streptomyces lividans*. ... Of the National Academy of Sciences.

Yu, L., Blaser, M., Andrei, P.I., Pierik, A.J., and Selmer, T. (2006). 4-Hydroxyphenylacetate Decarboxylases: Properties of a Novel Subclass of Glycyl Radical Enzyme Systems †. *Biochemistry* *45*, 9584–9592.

Zhang, Y., Zhu, X., Torelli, A.T., Lee, M., Dzikovski, B., Koralewski, R.M., Wang, E., Freed, J., Krebs, C., Ealick, S.E., et al. (2010). Diphthamide biosynthesis requires an organic radical generated by an iron-sulphur enzyme. *Nature* *465*, 891–896.

Zhao, X., Miller, J.R., Jiang, Y., Marletta, M.A., and Cronan, J.E. (2003). Assembly of the covalent linkage between lipoic acid and its cognate enzymes. *Chemistry & Biology* *10*, 1293–1302.

Zheng, G., Yan, L.Z., Vederas, J.C., and Zuber, P. (1999). Genes of the *sbo-alb* locus of *Bacillus subtilis* are required for production of the antilisterial bacteriocin subtilisin. *J Bacteriol* *181*, 7346–7355.

Zheng, G., Hehn, R., and Zuber, P. (2000). Mutational Analysis of the *sbo-alb* Locus of *Bacillus subtilis*: Identification of Genes Required for Subtilisin Production and Immunity. *J Bacteriol* *182*, 3266.

7. Anhang

DNA-Sequenzen der untersuchten Proteine

Im Folgenden sind die DNA-Sequenzen der in dieser Arbeit rekombinant hergestellten Proteine gezeigt. Die Primersequenzen sind unterstrichen.

AlbA

ATGGCGTTTATAGAGCAGATGTTTCCATTTATTAATGAAAGTGTAAGAGTTCACCAGCTTCCTGAGGGCGGCG
TGTTAGAAATCGACTACTTGCGCGATAATGTCTCCATTTCTGACTTTGAGTATTTGGATCTCAACAAAACGGC
TTACGAGCTCTGCATGCGCATGGATGGCCAAAAACAGCTGAGCAGATTTTAGCTGAGCAATGTGCAGTGTAT
GATGAATCACCAGGAAGACCATAAAGATTGGTATTACGACATGCTCAACATGCTCCAGAACAAGCAGGTTATTC
AGCTTGGAACCGGGCCAGCCGCCATACAATCACCACGAGCGGAAGCAATGAATTTCCGATGCCCCCTGCACGC
CACCTTTGAACTGACGCACCGCTGTAATTTGAAATGCGCCCACTGTTATTTGGAAAGCTCACCTGAAGCGCTC
GGCACCGTGTCGATTGAGCAATTCAAAAAACGGCTGATATGCTGTTTGATAACGGTGTATTGACATGCGAAA
TCACAGGTGGAGAAATTTTGTCCATCCAAACGCCAATGAGATTCTTGACTATGTGTGTAAAAAGTTCAAAAA
AGTCGCTGTCTTAACAAACGGAACACTCATGCGAAAAGAGAGCCTGGAGCTTTTGAAGACTTACAAGCAAAAA
ATCATCGTCGGCATTCTCTAGATAGTGTCAATTCGAGGTCCATGACTCCTTTAGAGGGAGAAAAGGCTCTT
TTGCCCCAACTTGTAACGATAAAATTGTTGAGTGACCACGGTATATTTGTCAGAGTCGCTATGTCTGTCTT
CGAAAAAACATGTGGGAAATCCACGATATGGCCCAAAGGTTTCGGGATCTCGGGGCGAAGGCGTTTTCTTAC
AATTGGGTTGACGATTTTCGGAAGAGGCAGGGATATTGTCCATCCAACGAAAGACGCCGAGCAGCACCGCAAGT
TTATGGAATACGAGCAACATGTGATTGATGAGTTTAAAGATCTGATTCCGATTATTCCCTATGAGAGAAAACG
CGCGGCAAATTGCGGCGCTGGCTGGAAGTCCATTGTGATCAGTCCGTTTCGGCGAAGTACGTCCTTGCGCCCTC
TTTCCAAAGGAATTTTCATTGGGAAATATTTTTCATGATTCCTATGAAAGCATCTTTAACTCCCCCTCTCGTCC
ATAAACTGTGGCAAGCGCAAGCGCCGCGGTTTCAGCGAACATTGCATGAAAGACAAATGCCCGTTTCAGCGGCTA
TTGCGGAGGCTGTTACTTAAAGGGCTGAACTCTAACAAATATCACCGGAAAAACATTTGCTCTTGGGCGAAA
AATGAACAATTAGAAGACGTGGTCCAGCTTATTTAG

SkfB

ATGTCATATGATCGTGTTAAAGATTTTGATTTGCCAGAGTTAGCGGTTTCATTTACAGCCTCATGGTGCTGTAA
TGATTGATAGAAAAAGTATGTTTTATTTACAGCTCAGTGACGTGGAGCACAGTTGGCGTTTCTGTTATCAAA
AAACAAAAATCTTCATAAAACGGCACGTATTTGGGAGATTATGAAAAAGAAGAGATGAGTGCTGACCAATTA
AAAGAAGAGCTTAGTGCCCATCCATTTACGGAGGCTTGACGGAAGGGCTGTTAGATCAGCCTTTACAGTTTT
CGGGTTCGCTAGATTTCATATTTACCTATTAGTTGTACCTTACAGTTGACAAATGCTTGTAATTTAAGCTGTTT
GTTTTGCTATGCCAGCTCAGGTAAACCATATCCTGAGGAATTATCTAGTGAACAATGGATATTGGTTATGCAA
AAGCTAGCAGCCCATGGAGTTGCTGATATTACGCTGACCGGGGTGAAGCAAAGCTGATCAAAGGGTTTAAAG
AATTAGTCGTTGTTGCAAGTTCGTTGTTTACCAATGTGAATGTATTTAGTAATGGATTGAACTGGCGAGATGA
AGAAGTTGAATTACTTAGTCACTTAGGCAATGTTTCTGTACAGATTAGTATTGATGGTATGGATAATACACAT
GACCAATTAAGAGGCAGAAAAGGCGGCTTTAAAGAAAGTATGAATACCATTAAAAAATTATCAGAAGCAAACA
TTCCAGTGATTGTCGCTATGACCATTAAATGAGTCCAATGCTGATGAAGTATCAGATGTGGTGGAGCAATGTGC
CAATGCGGGTGCTTTTATCTTTCTGTCAGGAAAAACGTTATCTGTTGGACGTGCGACAGAAGGCTTTAAGGCT

TTGGATATTGATTTTGAAGAAATGGTTCAAATACAGCTTAGGGAAGCACGTCATAAATGGGGAGATCGCCTGA
ACATAATTGATTGGGAGCACGAAGAGAGTTCGTTCAACAGATTTTTGTACACCAGGATATCTTGCTTGGA
TATAAGAGCAGATGGATACGTAACCTCTTGCCAATTAGAAGATTTGCCGCTAGGGCATATTTTAGAAGATAGC
ATGGCTGACATTGGTTACCTGCTCGTTTGCTTCAGTTAAATGTGAAGCAAAAAATTGCAAATGTATAGGA
AAATTGAGCTATCTGAACCGGACTTACCTTTTCAAAAAGAAGTCAAGGCAGGGATTGAGGAATGA

AS-Sequenzen der untersuchten Proteine

Im Folgenden sind die Aminosäuresequenzen der in dieser Arbeit rekombinant hergestellten Proteine gezeigt. Die Bindungsstellen der [4Fe-4S]-Cluster sind fett hervorgehoben.

AlbA

MFIEQMFPFINESVRVHQLPEGGVLEIDYLRDNVSISDFEYLDLNKTAYELCMRMDGQKT
AEQILAEQCAVYDESPEDHKDWYYDMLNMLQNKQVIQLGNRASRHTITTSNNEFPMPPLH
ATFELTHR**C**NLK**C**AH**C**YLESSPEALGTVSIEQFKKTADMLFDNGVLTCEITGGEIFVHPN
ANEILDYVCKKFKKVAVLTNGTLMRKESLELLKTYKQKIIVGISLDSVNSEVHDSFRGRK
GSFAQTCKTIKLLSDHGI FVRVAMSVFEKNMWEIHDMAQKVRDLGAKAFSYNWVDDFGRG
RDIVHPTKDAEQHRKFMEEYEQHVIDEFKDLIPIIPYERKRAANCGAGWKSIVISPFGEVR
PCALFPKEFSLGNIFHDSYESIFNSPLVHKLWQAQAPRFSEHCMKDK**C**PFSGY**C**GG**C**YLK
GLNSNKYHRKNICSWAKNEQLEDVVQLI

SkfB

DRKSMFYFRLSGRGAQLAFLLSKNKNLHKTARIWEIMKKEEMSADQLKEETEGLLDQPLH
VSGSLDSYLPISCTLQLTN**C**NLS**C**SF**C**YASSGKPYPEELSSEQWILVMQKLAHGVADI
TLTGGEAKLIKGFKELVVVASSLFTNVNVFSNGLNWRDEEVELLSHLGNVSVQISIDGMD
NTHDQLRGRKGGFKESMNTIKKLSEANIPVIVAMTINESNADEVSDVVEQCANAGAFIFR
AGKTLVGRATEGFKALDIDFEEMVQIQLEARHKWGDRLNIIDWEHEESSFTTDFCTPG
YLAWYIRADGYVTPCQLEDLPLGHILEDSMADIGSPARLLQLK**C**EAKN**C**K**C**IGKIELSEP
DLPFQKEVKAGIQE

5'-Desoxyadenosin Kalibrierung

Für die Berechnung der 5'-Desoxyadenosinkonzentration in den Assays aus den Integralflächen wurde folgende Gleichung verwendet (Gattner, 2010):

$$\text{Integralfläche} = 49,789 \times [5'\text{-dA}]$$

Tabellen und Abbildungen

Tabelle A.1: Messwerte die für die Bestimmung der Eichgerade der Eisenbestimmung erhalten wurden.

Eisenmenge	optische Dichte bei 593 nm
2 nmol	0.094
5 nmol	0.158
10 nmol	0.359
20 nmol	0.678
30 nmol	1.006
40 nmol	1.327

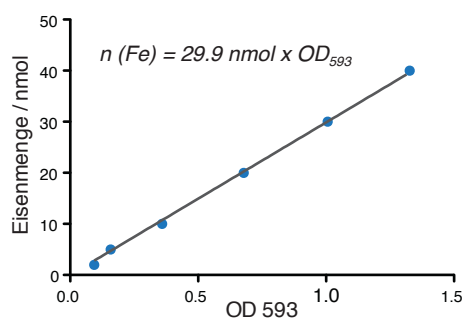


Abbildung A.1: Eichgerade zur Eisenbestimmung

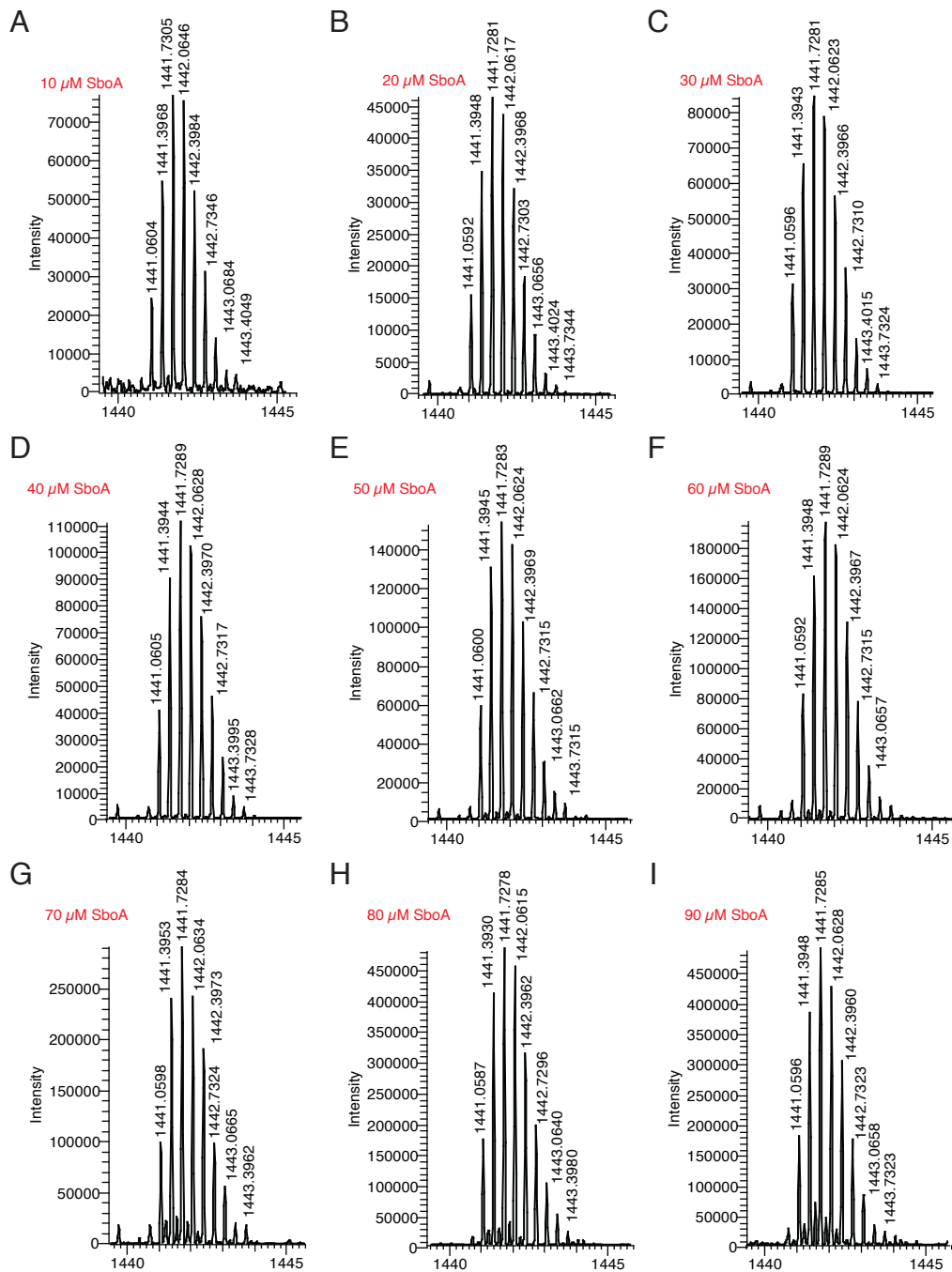


Abbildung A.2: HPLC-HRMS-Analyse von verschiedenen konzentrierten SboA Lösungen. (A) bis {I) Massenspektren der jeweiligen detektierten dreifach geladenen SboA-Spezies. Es wurden jeweils 50 µL Lösung injiziert. Ab einer Konzentration von 80 µM ist SboA sehr gut zu detektieren.

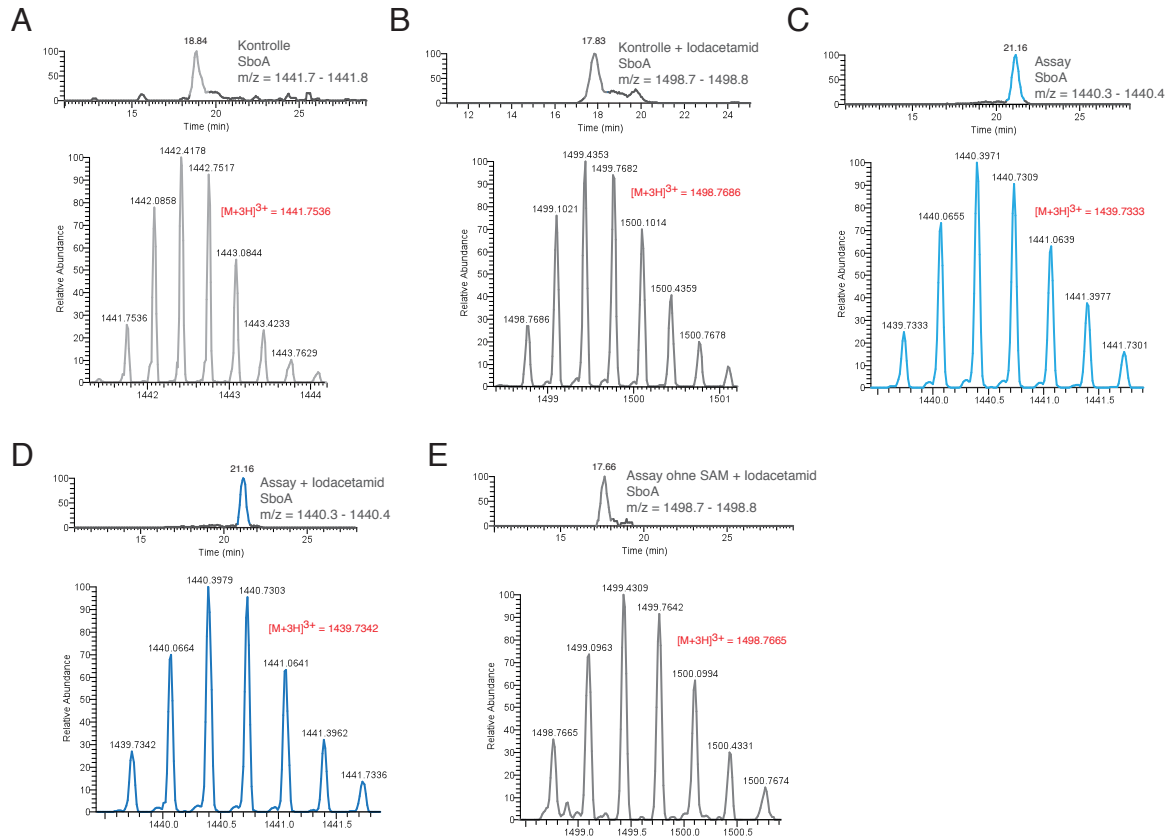


Abbildung A.3: Detaillierte Übersicht der Ergebnisse der HPLC-HRMS-Analyse der SboA-Modifikationsassays. (A) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Kontrollassays ohne AlbA und detailliertes Massenspektrum der detektierten SboA-Spezies. (B) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Kontrollassays ohne AlbA mit Zugabe von Iodacetamid und detailliertes Massenspektrum der detektierten SboA-Spezies. (C) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Assays mit AlbA und detailliertes Massenspektrum der detektierten SboA-Spezies. (D) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Assays mit AlbA mit Zugabe von Iodacetamid und detailliertes Massenspektrum der detektierten SboA-Spezies. (E) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Kontrollassays ohne SAM mit Zugabe von Iodacetamid und detailliertes Massenspektrum der detektierten SboA-Spezies.

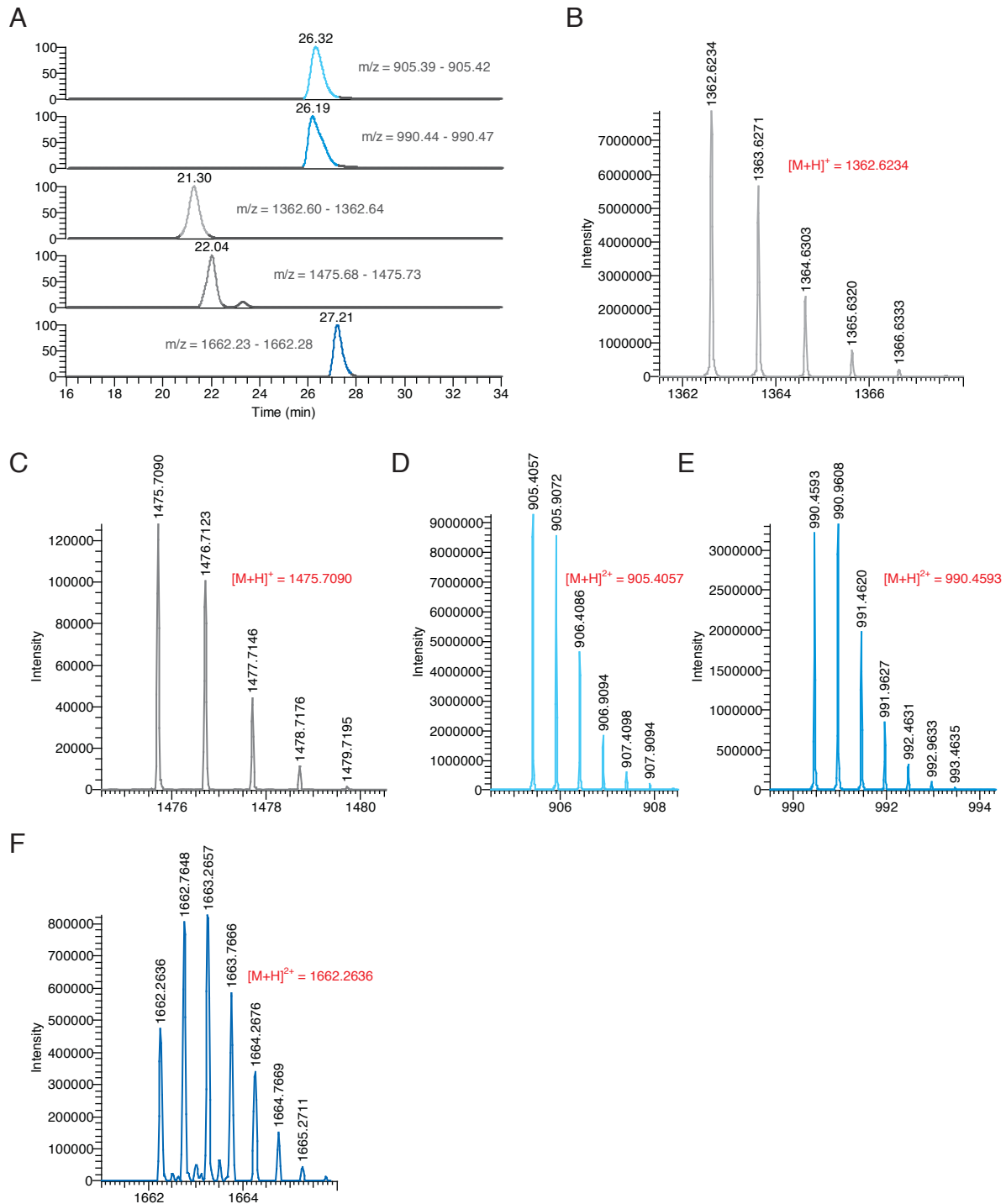


Abbildung A.4: Übersicht über die Ergebnisse der HPLC-HRMS-Analyse des Thermolysinverdaus von Subtilisin A. (A) Extrahierte Ionenchromatogramme der fünf Subtilisin A Fragmente die beim Thermolysinverdaus gebildet werden. (B) Massenspektrum von Fragment II. (C) Massenspektrum von Fragment I. (D) Massenspektrum von Fragment V. (E) Massenspektrum von Fragment III. (F) Massenspektrum von Fragment IV.

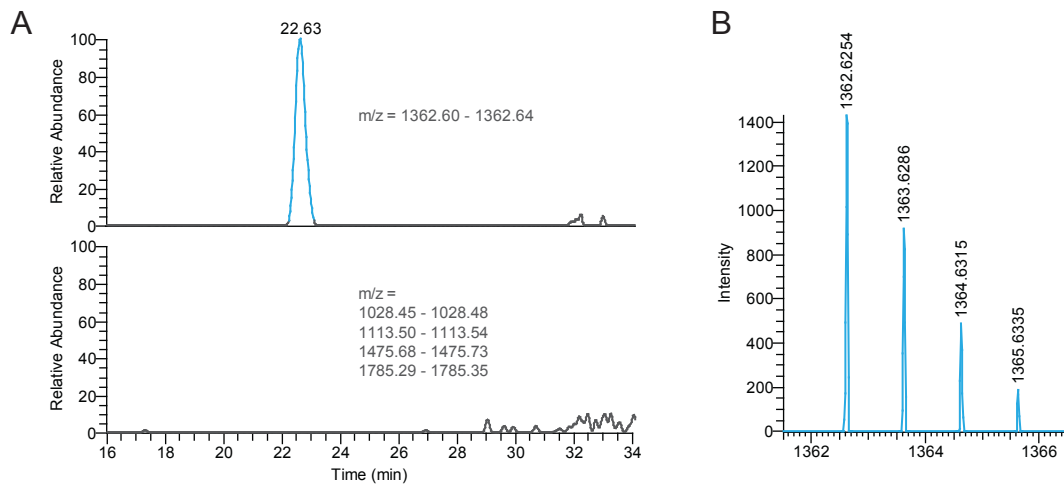


Abbildung A.5: Überblick über die Ergebnisse der HPLC-HRMS-Analyse des Thermolysinverdaus von 3b-SboA. (A) Extrahierte Ionenchromatogramme der erwarteten 3b-SboA Fragmente. Es ist nur eine Verbindung, die das m/z-Verhältnis von Fragment II besitzt, zu identifizieren. (B) Massenspektrum von Fragment II. Im Vergleich zum Thermolysinverdaus von Subtilosin A ist die Intensität um den Faktor 5000 geringer.

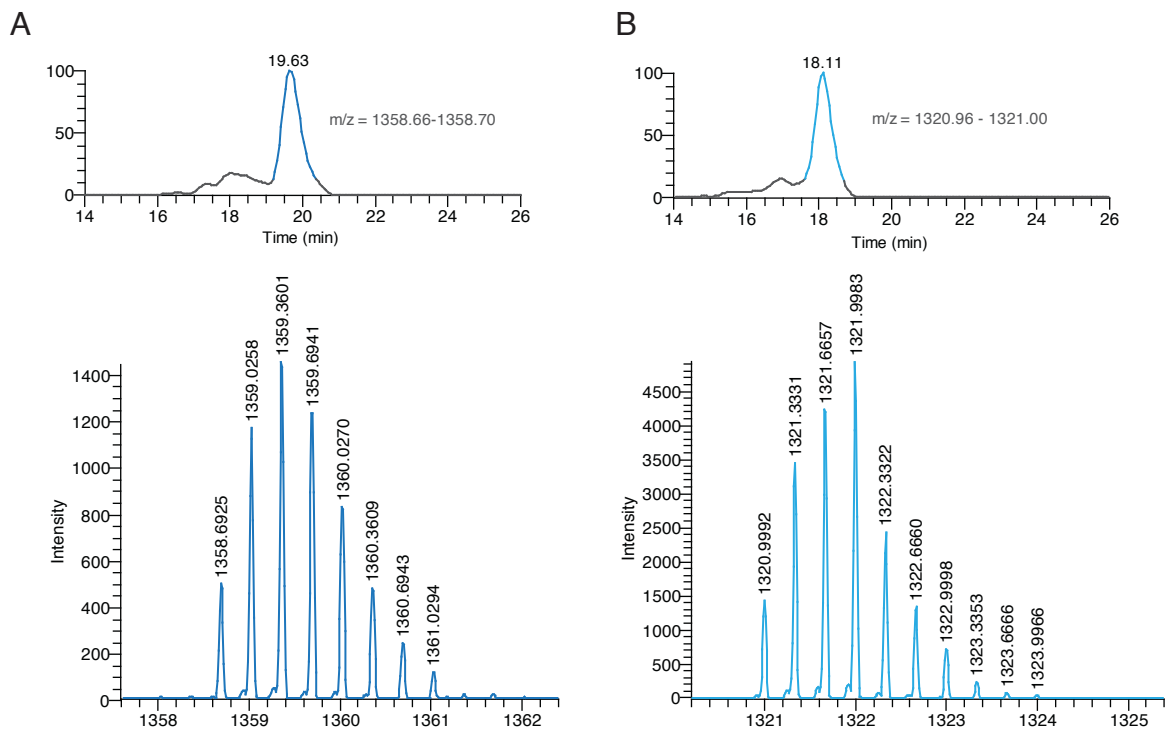


Abbildung A.6: Überblick über die Ergebnisse der HPLC-HRMS-Analyse des Carboxypeptidaseverdaus von 3b-SboA. (A) Extrahiertes Ionenchromatogramm und Massenspektrum von zweifach verkürzten 3b-SboA. (B) Extrahiertes Ionenchromatogramm und Massenspektrum von dreifach verkürzten 3b-SboA.

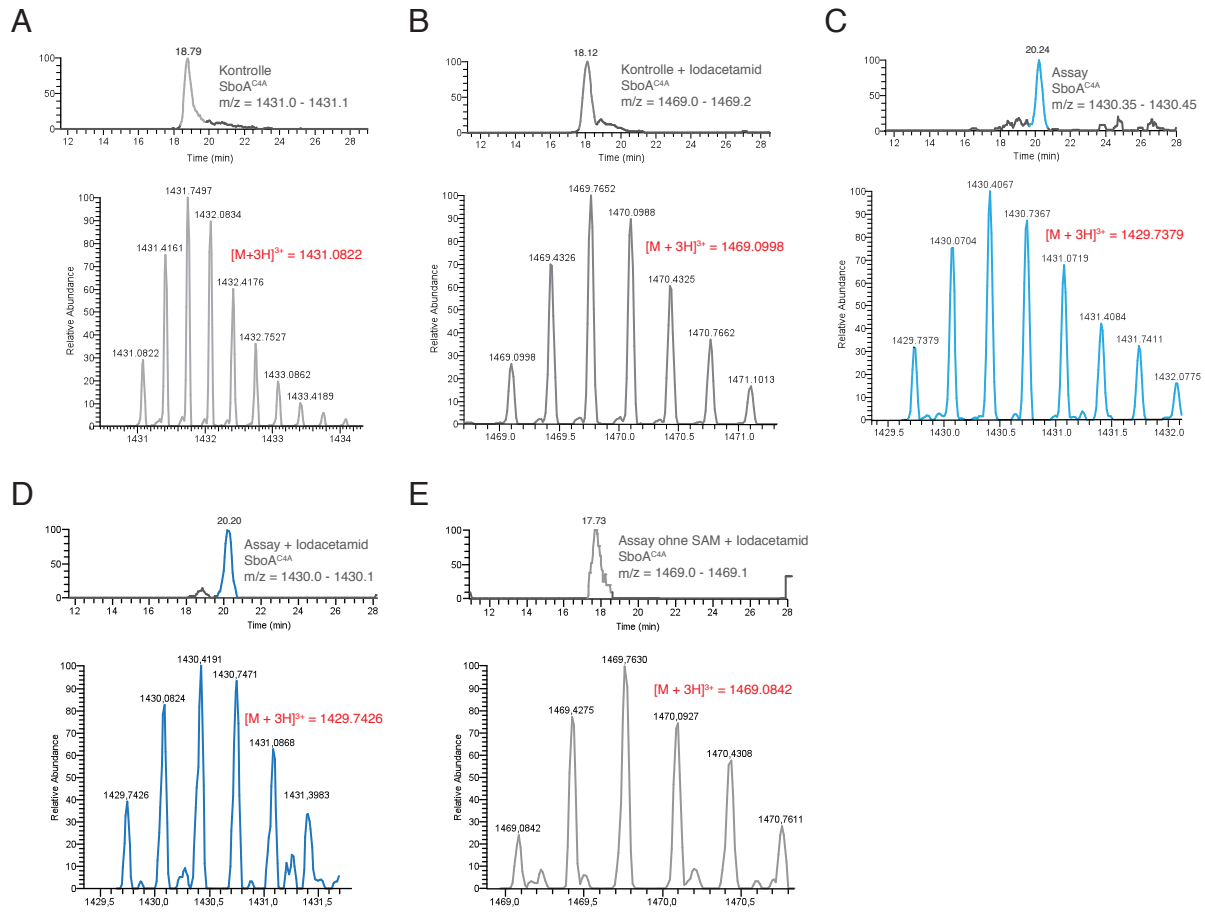


Abbildung A.7: Detaillierte Übersicht der Ergebnisse der HPLC-HRMS-Analyse der SboA^{C4A}-Modifikationsassays. (A) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Kontrollassays ohne AlbA und detailliertes Massenspektrum der detektierten SboA^{C4A}-Spezies. (B) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Kontrollassays ohne AlbA mit Zugabe von Iodacetamid und detailliertes Massenspektrum der detektierten SboA^{C4A}-Spezies. (C) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Assays mit AlbA und detailliertes Massenspektrum der detektierten SboA^{C4A}-Spezies. (D) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Assays mit AlbA mit Zugabe von Iodacetamid und detailliertes Massenspektrum der detektierten SboA^{C4A}-Spezies. (E) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Kontrollassays ohne SAM mit Zugabe von Iodacetamid und detailliertes Massenspektrum der detektierten SboA^{C4A}-Spezies.

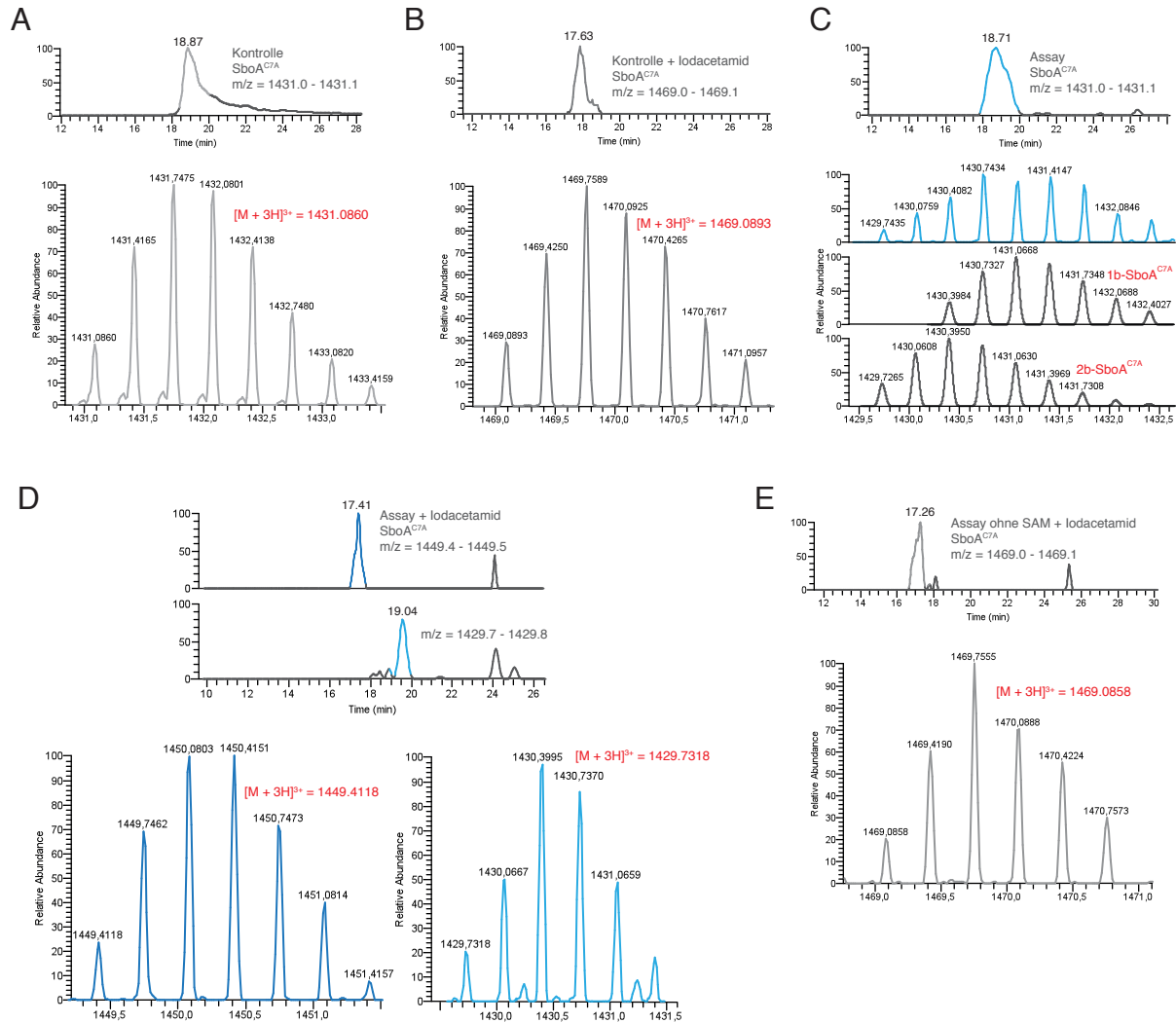


Abbildung A.8: Detaillierte Übersicht der Ergebnisse der HPLC-HRMS-Analyse der SboA^{C7A}-Modifikationsassays. (A) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Kontrollassays ohne AlbA und detailliertes Massenspektrum der detektierten SboA^{C7A}-Spezies. (B) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Kontrollassays ohne AlbA mit Zugabe von Iodacetamid und detailliertes Massenspektrum der detektierten SboA^{C7A}-Spezies. (C) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Assays mit AlbA und detailliertes Massenspektrum der detektierten SboA^{C7A}-Spezies. Die berechneten Massen-spektren von 1b-SboA^{C7A} und 2b-SboA^{C7A} mit angegeben. (D) Extrahierte Ionenchromatogramme des Assays mit AlbA mit Zugabe von Iodacetamid und detailliertes Massenspektrum der detektierten SboA^{C7A}-Spezies. (E) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Kontrollassays ohne SAM mit Zugabe von Iodacetamid und detailliertes Massenspektrum der detektierten SboA^{C7A}-Spezies.

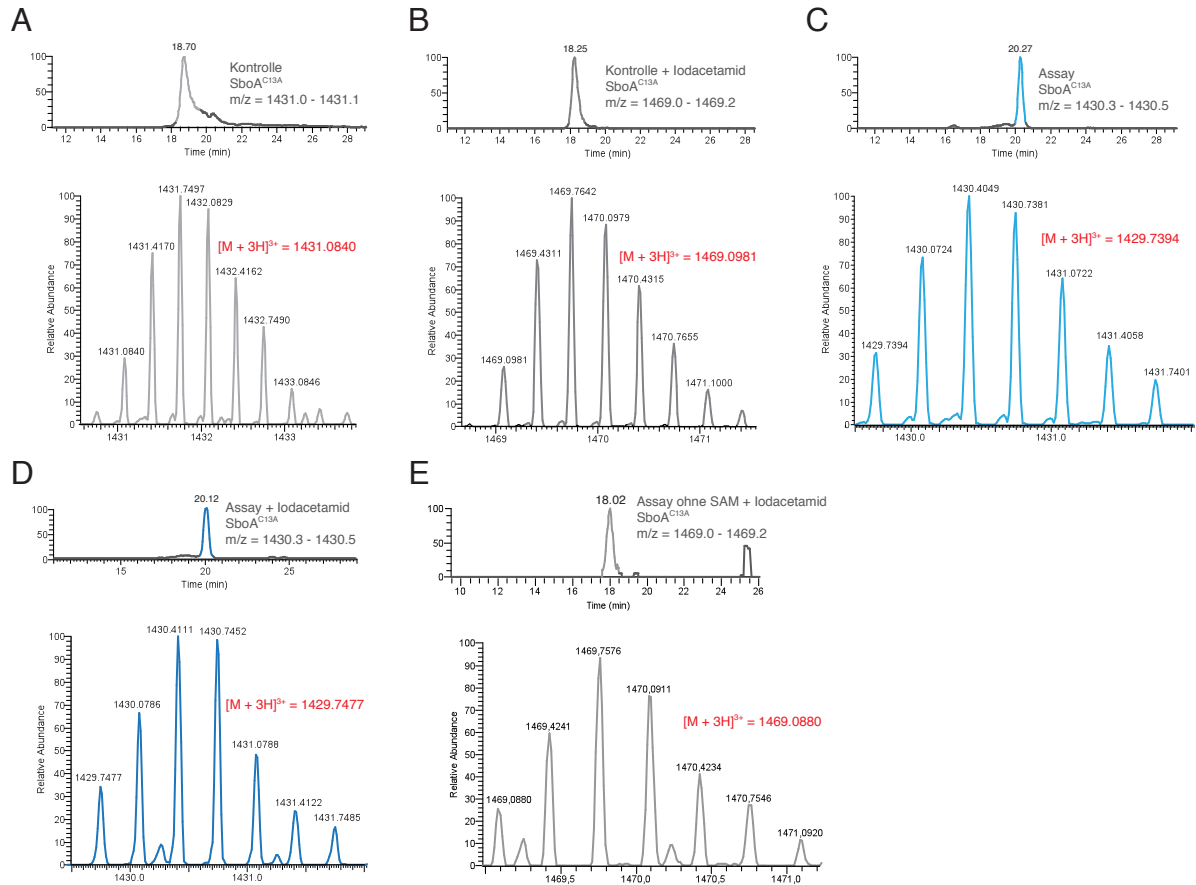


Abbildung A.9: Detaillierte Übersicht der Ergebnisse der HPLC-HRMS-Analyse der SboA^{C13A}-Modifikationsassays. (A) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Kontrollassays ohne AlbA und detailliertes Massenspektrum der detektierten SboA^{C13A}-Spezies. (B) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Kontrollassays ohne AlbA mit Zugabe von Iodacetamid und detailliertes Massenspektrum der detektierten SboA^{C13A}-Spezies. (C) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Assays mit AlbA und detailliertes Massenspektrum der detektierten SboA^{C13A}-Spezies. (D) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Assays mit AlbA mit Zugabe von Iodacetamid und detailliertes Massenspektrum der detektierten SboA^{C13A}-Spezies. (E) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Kontrollassays ohne SAM mit Zugabe von Iodacetamid und detailliertes Massenspektrum der detektierten SboA^{C13A}-Spezies.

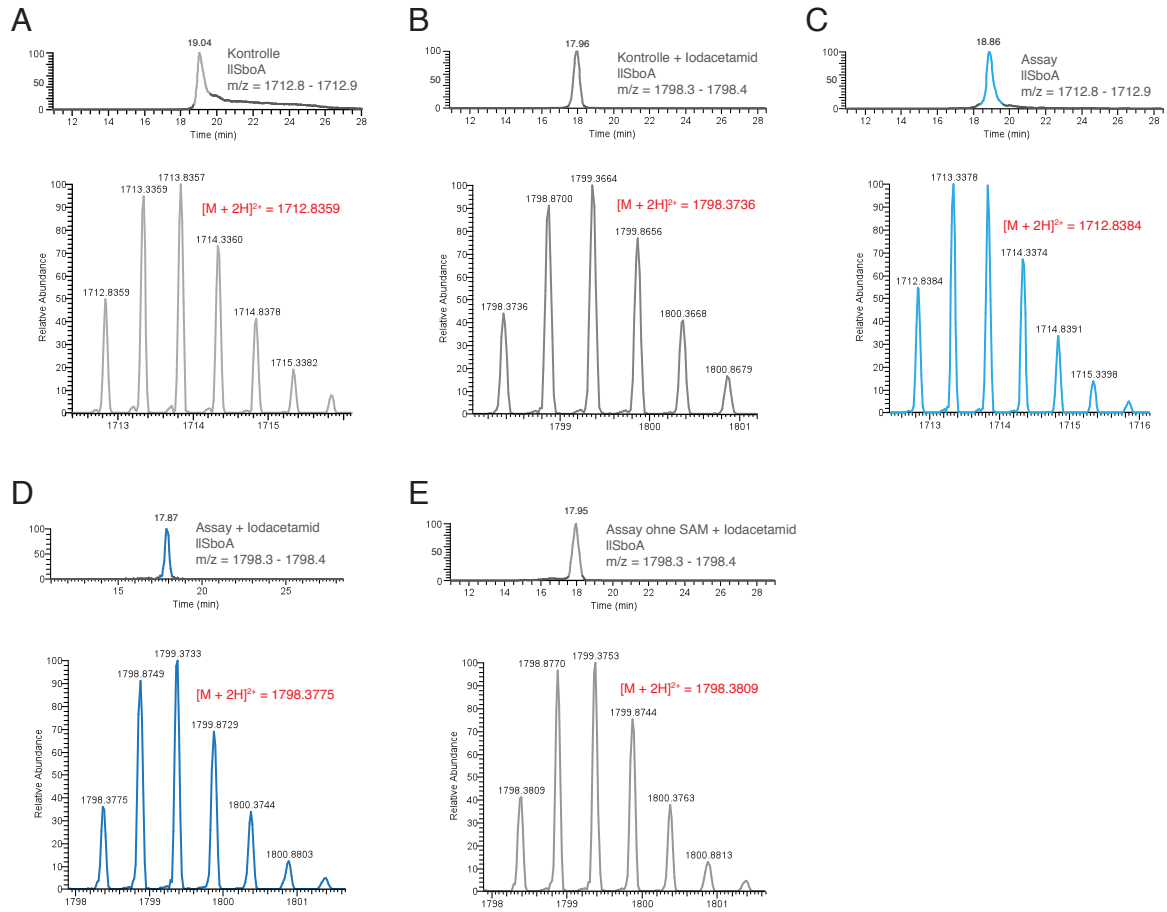


Abbildung A.10: Detaillierte Übersicht der Ergebnisse der HPLC-HRMS-Analyse der IISboA-Modifikationsassays. (A) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Kontrollassays ohne AlbA und detailliertes Massenspektrum der detektierten IISboA-Spezies. (B) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Kontrollassays ohne AlbA mit Zugabe von Iodacetamid und detailliertes Massenspektrum der detektierten IISboA-Spezies. (C) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Assays mit AlbA und detailliertes Massenspektrum der detektierten IISboA-Spezies. (D) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Assays mit AlbA mit Zugabe von Iodacetamid und detailliertes Massenspektrum der detektierten IISboA-Spezies. (E) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Kontrollassays ohne SAM mit Zugabe von Iodacetamid und detailliertes Massenspektrum der detektierten IISboA-Spezies.

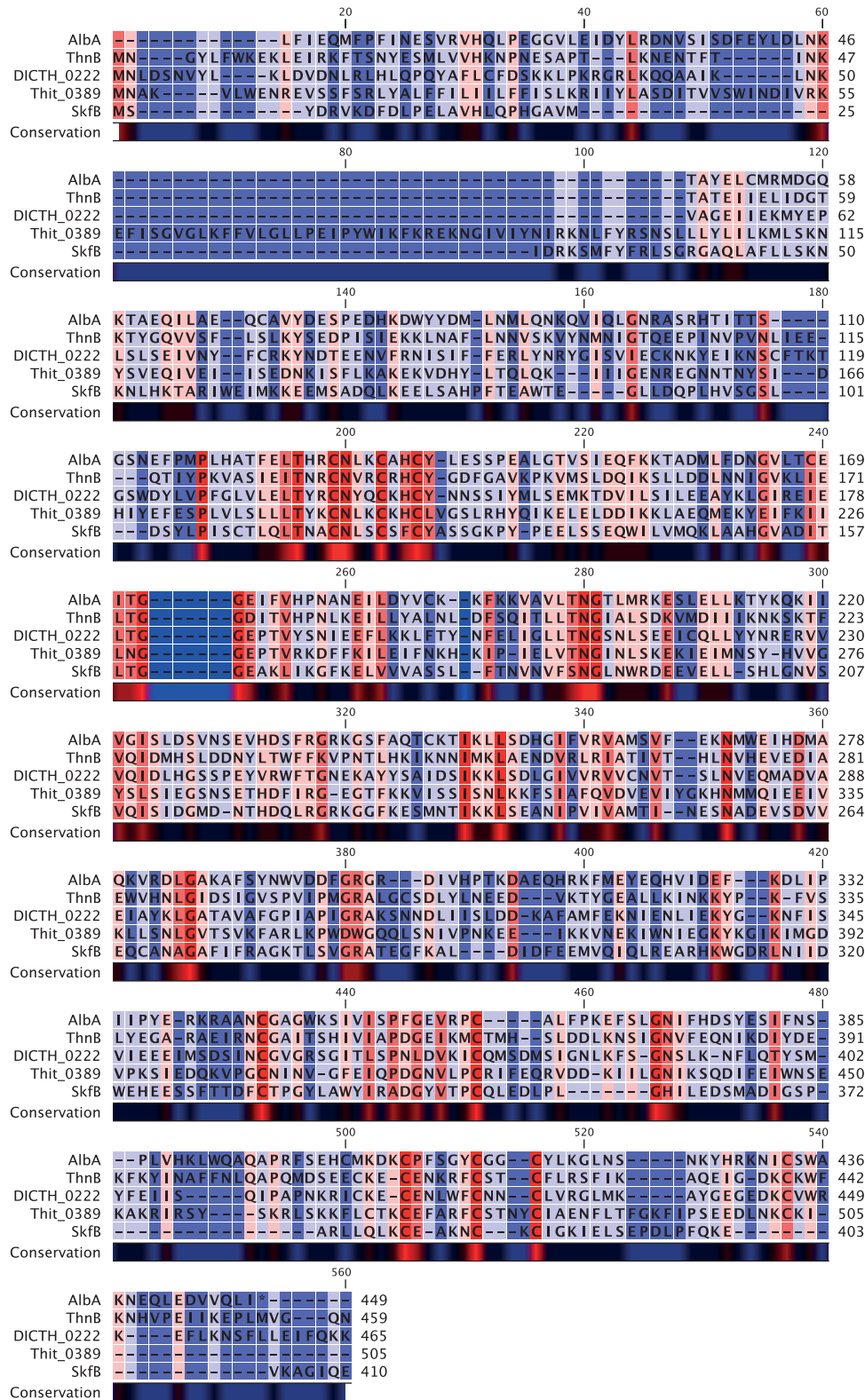


Abbildung A.11: Vollständiges Alignment von fünf Radical SAM Enzymen die an der Biosynthese von Sactipeptiden oder an der Biosynthese von putativen Sactipeptiden involviert sind. Im N-terminalen Bereich ist in allen Enzymen das charakteristische CXXXCXXC-Motiv konserviert. In der C-terminalen Region sind drei weitere Cysteine konserviert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese Cysteine in AlbA und SkfB einen weiteren [4Fe-4S]-Cluster koordinieren.

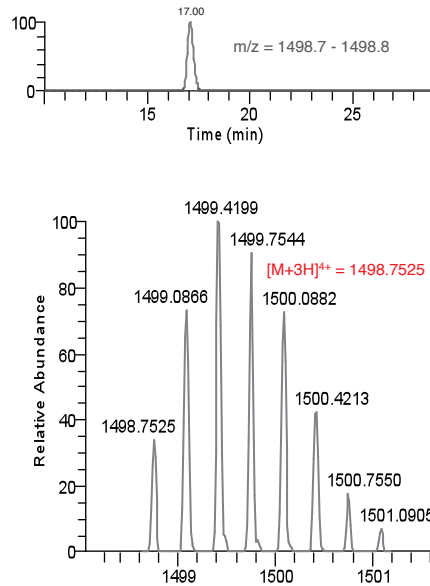


Abbildung A.12: Extrahiertes Ionenchromatogramm des SboA-Modifikationsassays mit AlbA^{C408A C414A C417A} und detailliertes Massenspektrum der detektierten SboA-Spezies.

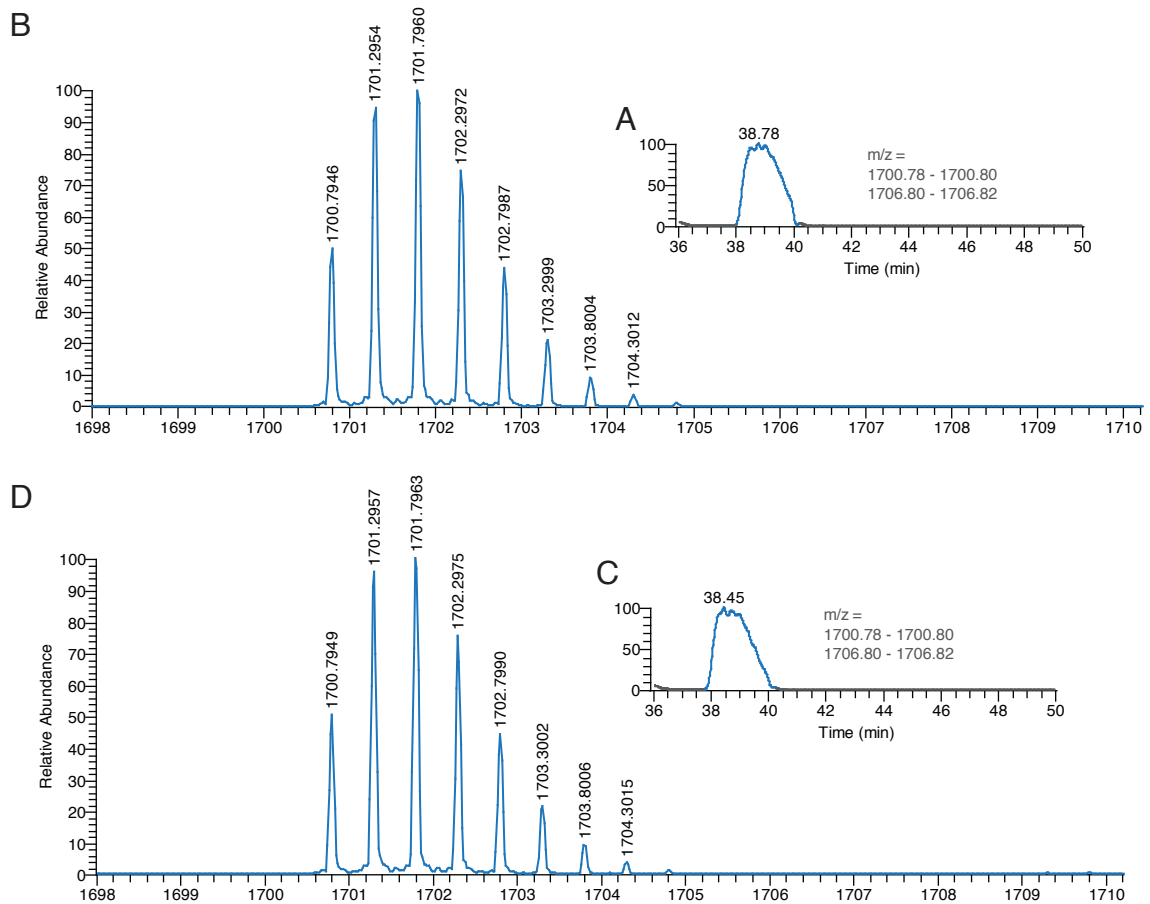


Abbildung A.13: Überblick über die Ergebnisse der HPLC-HRMS-Analyse der Überstandextrakte der Fermentation der Subtilisin A^{T6I}-Variante. (A) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Überstandsextraktes der Fermentation der Subtilisin A^{T6I}-Variante ohne Zugabe von IPTG. (B) Zugehöriges Massenspektrum des in (A) extrahierten Peaks. (C) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Überstandsextraktes der Fermentation der Subtilisin A^{T6I}-Variante mit Zugabe von IPTG. (D) Zugehöriges Massenspektrum des in (C) extrahierten Peaks.

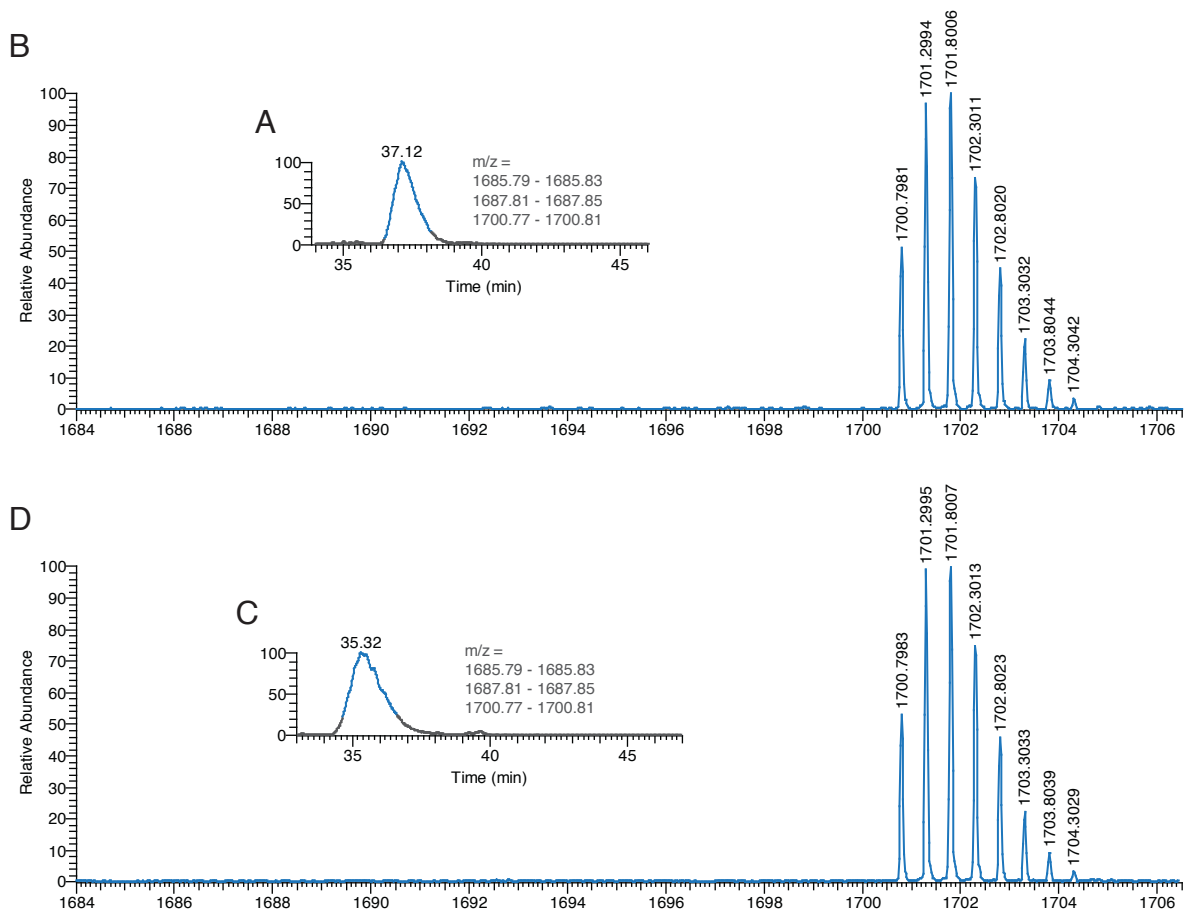


Abbildung A.14: Überblick über die Ergebnisse der HPLC-HRMS-Analyse der Überstandsextrakte der Fermentation der Subtilisin A^{C7A}-Variante. (A) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Überstandsextraktes der Fermentation der Subtilisin A^{C7A}-Variante ohne Zugabe von IPTG. (B) Zugehöriges Massenspektrum des in (A) extrahierten Peaks. (C) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Überstandsextraktes der Fermentation der Subtilisin A^{C7A}-Variante mit Zugabe von IPTG. (D) Zugehöriges Massenspektrum des in (C) extrahierten Peaks.

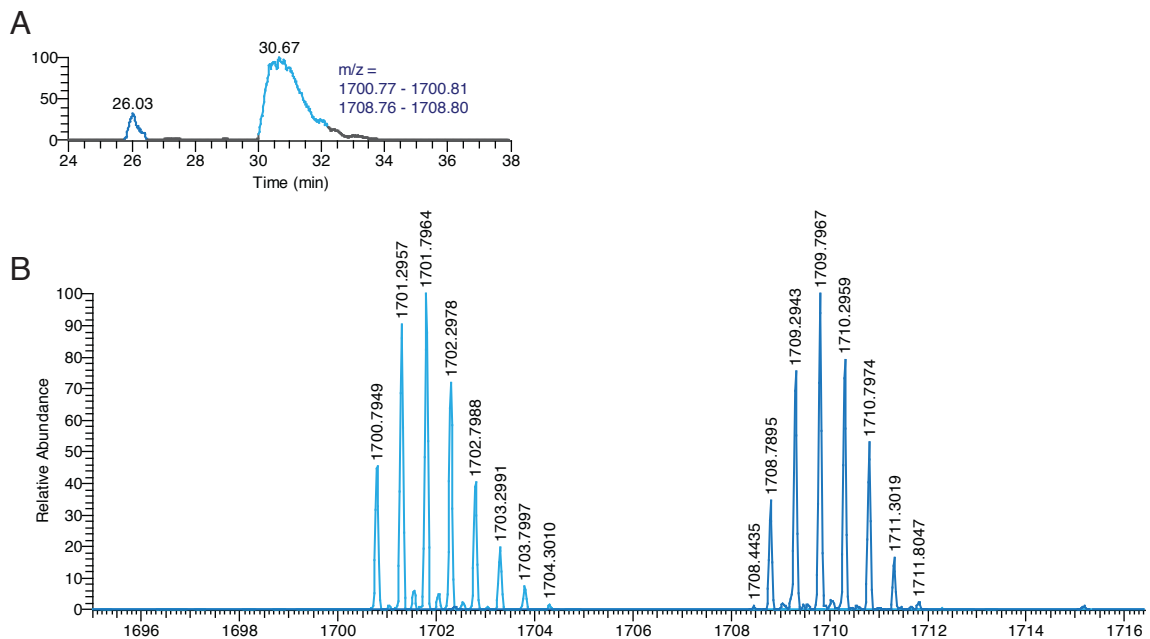


Abbildung A.15: Überblick über die Ergebnisse der HPLC-HRMS-Analyse der Überstandsextrakte der Fermentation der Subtilisin A^{F31Y}-Variante. (A) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Überstandsextraktes der Fermentation der Subtilisin A^{F31Y}-Variante ohne Zugabe von IPTG. (B) Zugehöriges Massenspektrum des in (A) extrahierten Peaks. (C) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Überstandsextraktes der Fermentation der Subtilisin A^{F31Y}-Variante mit Zugabe von IPTG. (D) Zugehöriges Massenspektrum des in (C) extrahierten Peaks.

Tabelle A.2: Übersicht über die Retentionszeiten der verschiedenen durch heterologe Expression in *E. coli* hergestellte SerSkfA-Varianten.

SerSkfA-Variante	Retentionszeit	SerSkfA-Variante	Retentionszeit
SerSkfA ^{C4A}	12.4 min	SerSkfA ^{M12S}	11.9 min
SerSkfA ^{C4S}	12.2 min	SerSkfA ^{M12F}	12.4 min
SerSkfA ^{M12A}	12.1 min	SerSkfA ^{M12L}	12.5 min
SerSkfA ^{M12T}	11.9 min	SerSkfA ^{M12Q}	12.4 min
SerSkfA ^{M12Y}	12.5 min	SerSkfA ^{M12K}	11.7 min
SerSkfA ^{M12N}	11.9 min	SerSkfA ^{C4M M12C}	12.3 min
SerSkfA ^{M12E}	11.7 min		

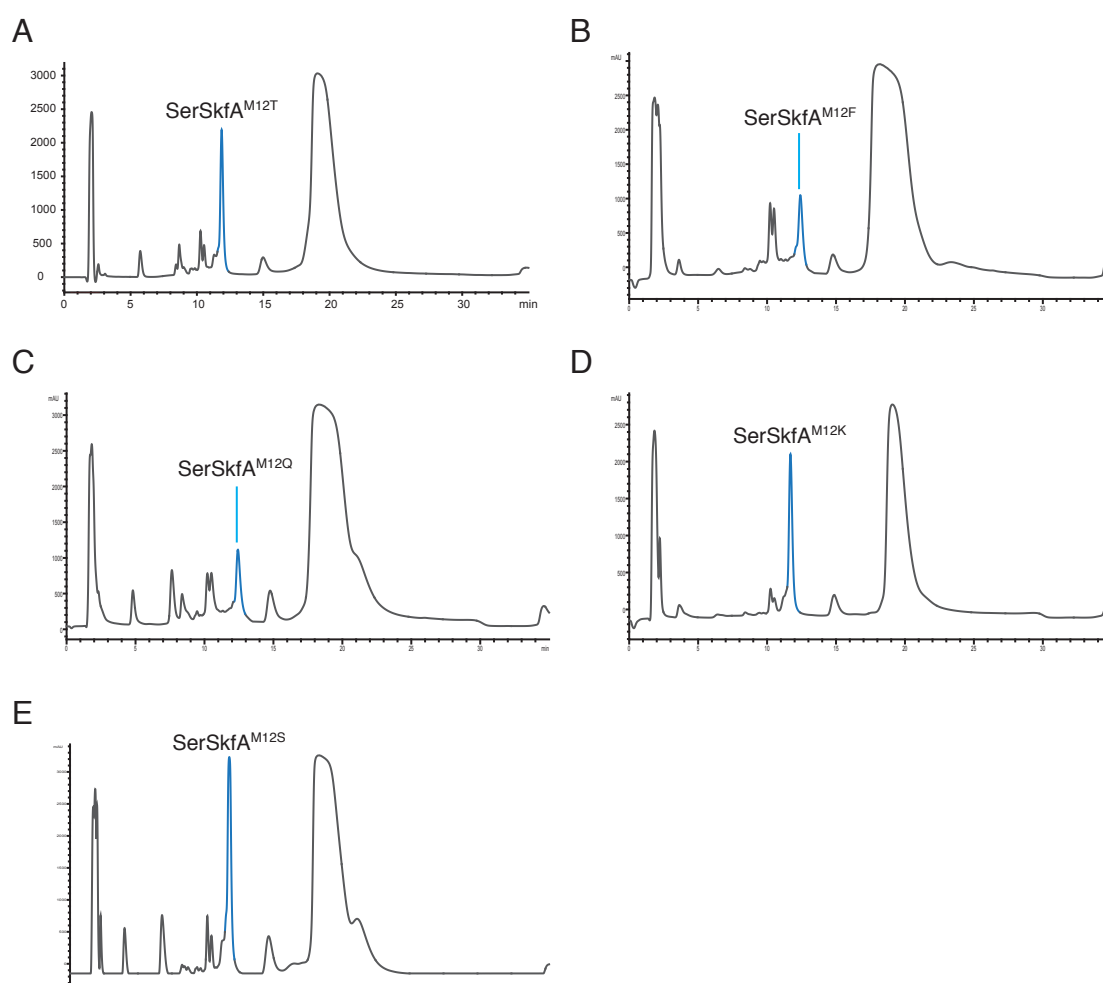


Abbildung A.16: Übersicht über die HPLC Chromatogramme der Reinigung der verschiedenen SerSkfA-Varianten nach erfolgreicher TEV-Spaltung ((A) bis (E)). Die jeweils gesammelte und lyophilisierte Fraktion ist blau markiert.

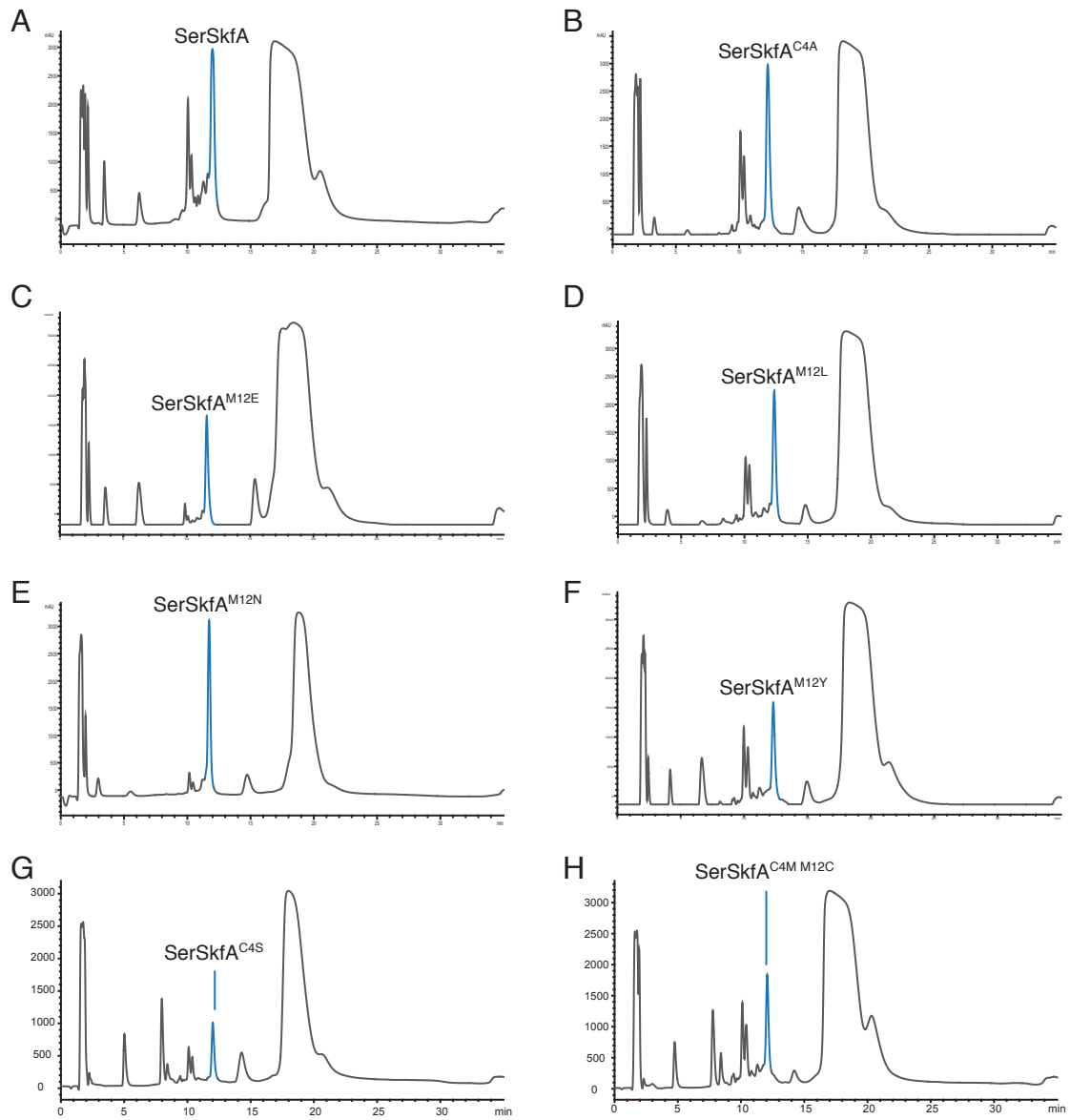


Abbildung A.17: Übersicht über die HPLC Chromatogramme der Reinigung der verschiedenen SerSkfA-Varianten nach erfolgreicher TEV Spaltung ((A) bis (H)). Die jeweils gesammelte und lyophilisierte Fraktion ist blau markiert.

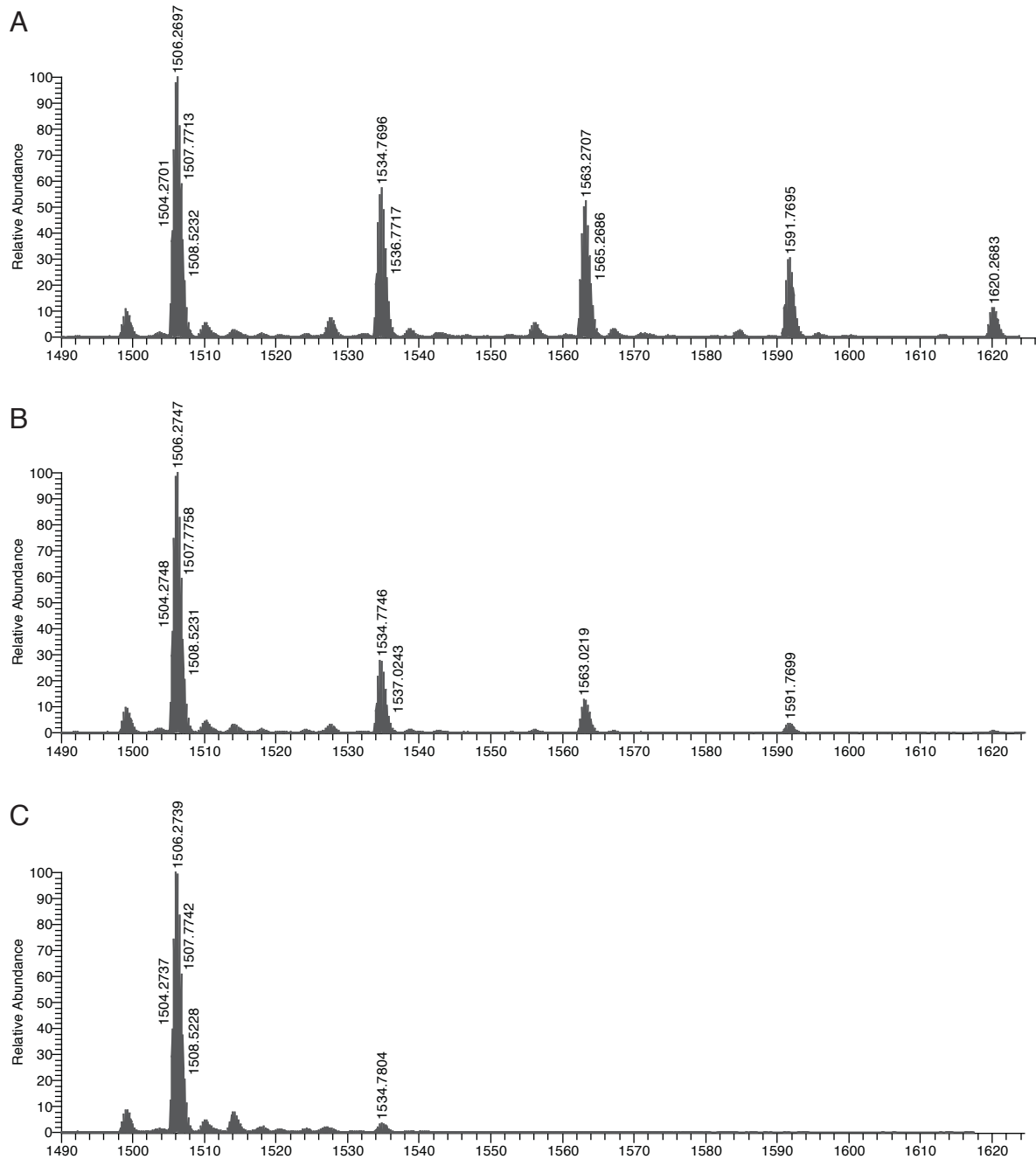


Abbildung A.18: Überblick über die Massenspektren von SerSkfA mit verschiedenen *in-source* Fragmentierungsspannungen. (A) SerSkfA Massenspektrum mit einer *in-source* Fragmentierungsspannung von 10 V. Es sind vier verschiedene SerSkfA-TFA Addukte zu identifizieren. (B) SerSkfA Massenspektrum mit einer *in-source* Fragmentierungsspannung von 20 V. Neben SerSkfA sind drei SerSkfA-TFA Addukte zu beobachten. (C) SerSkfA Massenspektrum mit einer *in-source* Fragmentierungsspannung von 40 V. Neben dem SerSkfA Spektrum ist nur noch eine geringere Menge an SerSkfA-TFA Addukt zu beobachten.

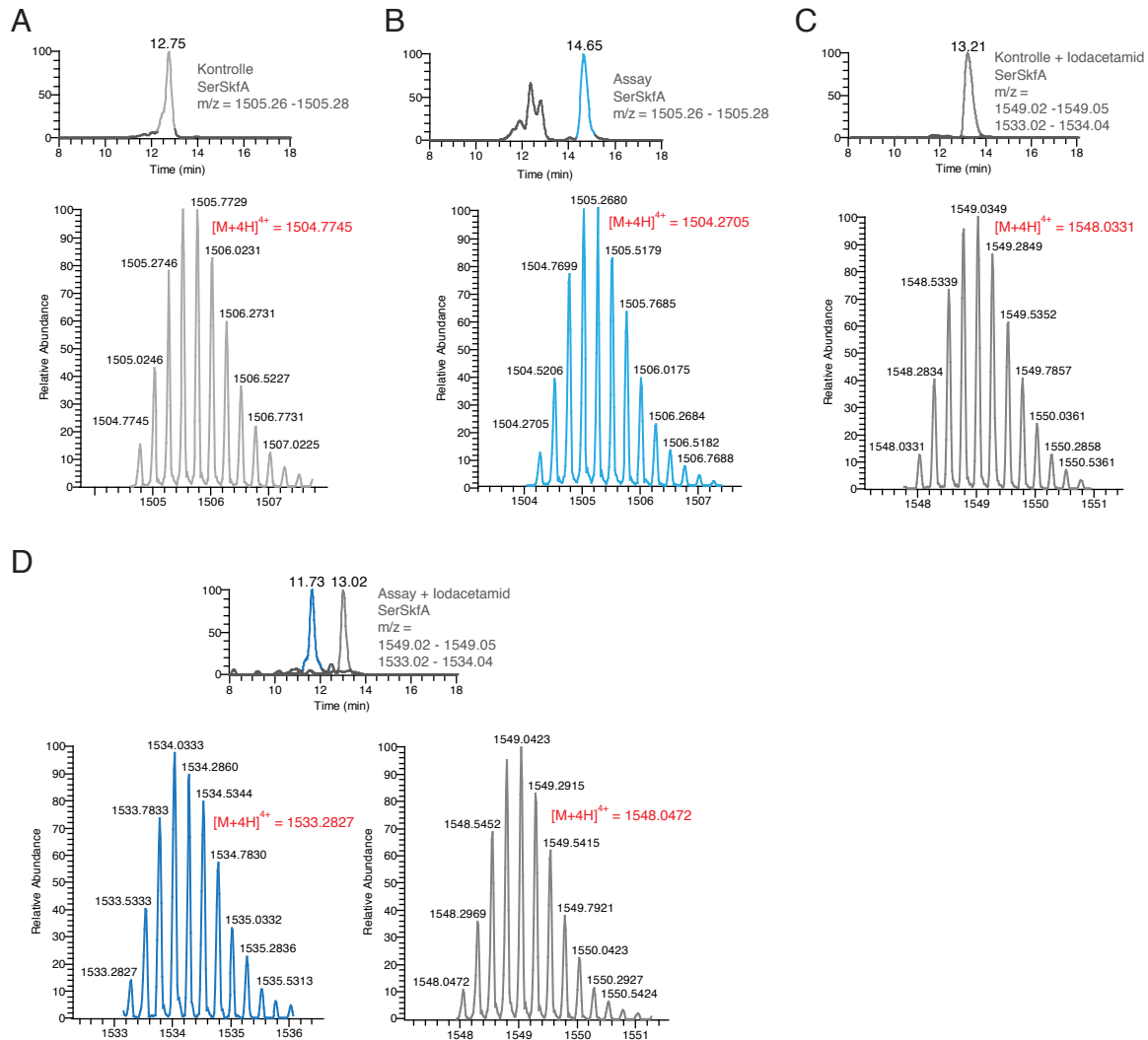


Abbildung A.19: Detaillierte Übersicht der Ergebnisse der HPLC-HRMS-Analyse der SerSkfA-Modifikationsassays. (A) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Kontrollassays ohne SkfB und detailliertes Massenspektrum der detektierten SerSkfA-Spezies. (B) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Kontrollassays ohne SkfB mit Zugabe von Iodacetamid und detailliertes Massenspektrum der detektierten SerSkfA-Spezies. (C) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Assays mit SkfB und detailliertes Massenspektrum der detektierten SerSkfA-Spezies. (D) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Assays mit SkfB mit Zugabe von Iodacetamid und detaillierte Massenspektren der detektierten SerSkfA-Spezies.

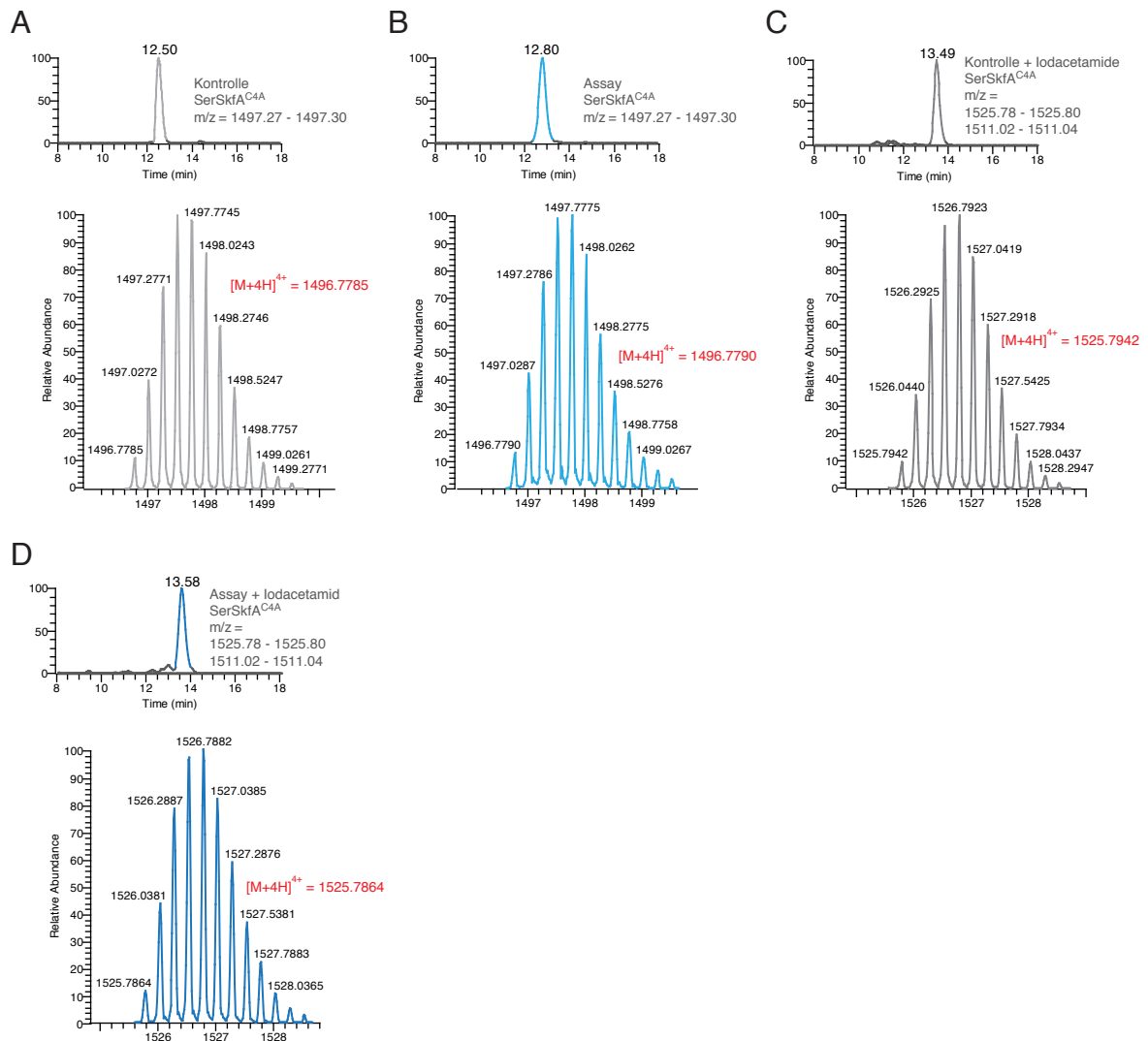


Abbildung 4.20: Detaillierte Übersicht der Ergebnisse der HPLC-HRMS-Analyse der SerSkfA^{C4A}-Modifikationsassays. (A) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Kontrollassays ohne SkfB und detailliertes Massenspektrum der detektierten SerSkfA^{C4A}-Spezies. (B) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Kontrollassays ohne SkfB mit Zugabe von Iodacetamid und detailliertes Massenspektrum der detektierten SerSkfA^{C4A}-Spezies. (C) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Assays mit SkfB und detailliertes Massenspektrum der detektierten SerSkfA^{C4A}-Spezies. (D) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Assays mit SkfB mit Zugabe von Iodacetamid und detailliertes Massenspektrum der detektierten SerSkfA^{C4A}-Spezies.

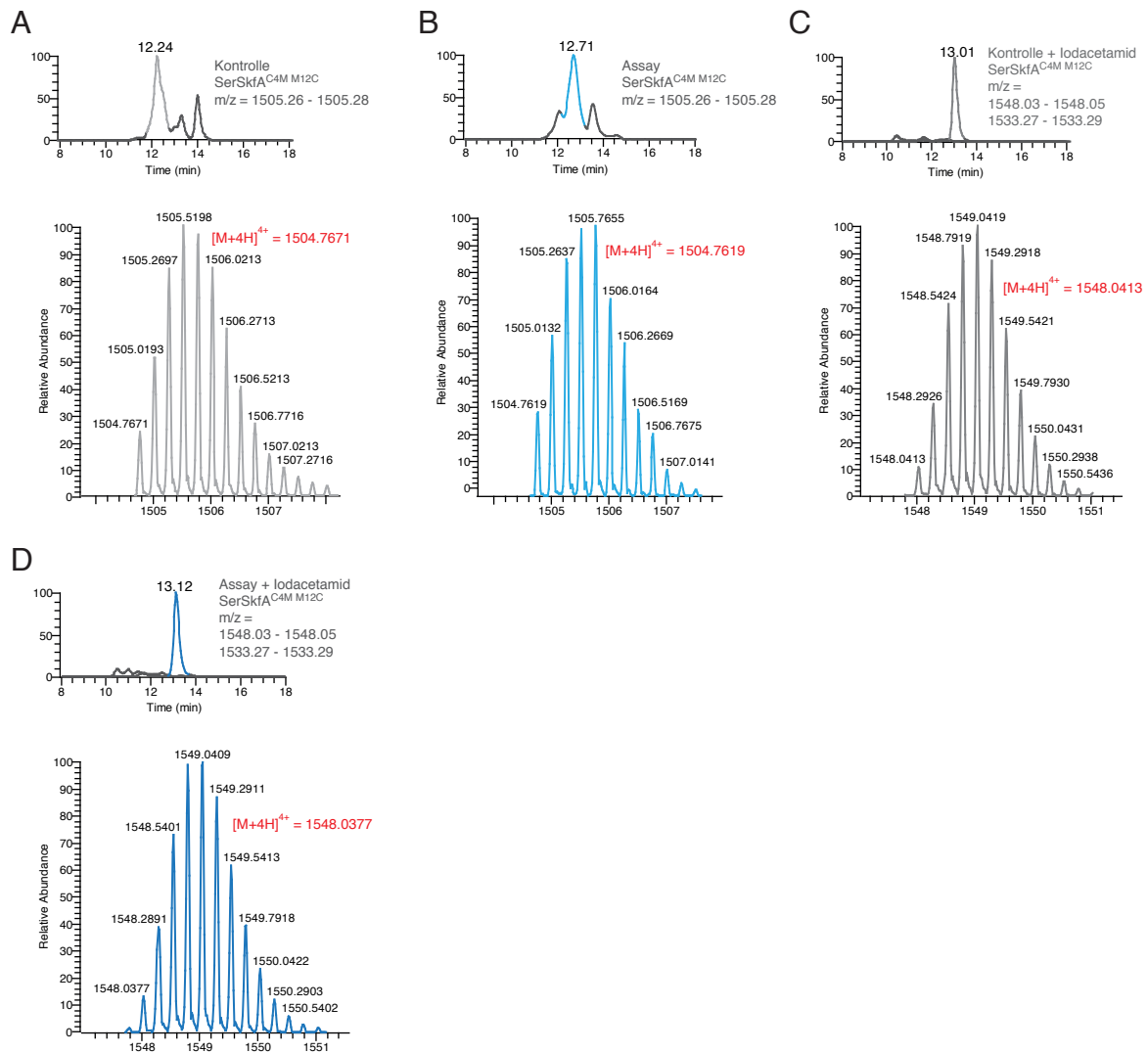


Abbildung 4.21: Detaillierte Übersicht der Ergebnisse der HPLC-HRMS-Analyse der SerSkfA^{C4M M12C}-Modifikationsassays. (A) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Kontrollassays ohne SkfB und detailliertes Massenspektrum der detektierten SerSkfA^{C4M M12C}-Spezies. (B) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Kontrollassays ohne SkfB mit Zugabe von Iodacetamid und detailliertes Massenspektrum der detektierten SerSkfA^{C4M M12C}-Spezies. (C) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Assays mit SkfB und detailliertes Massenspektrum der detektierten SerSkfA^{C4M M12C}-Spezies. (D) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Assays mit SkfB mit Zugabe von Iodacetamid und detailliertes Massenspektrum der detektierten SerSkfA^{C4M M12C}-Spezies.

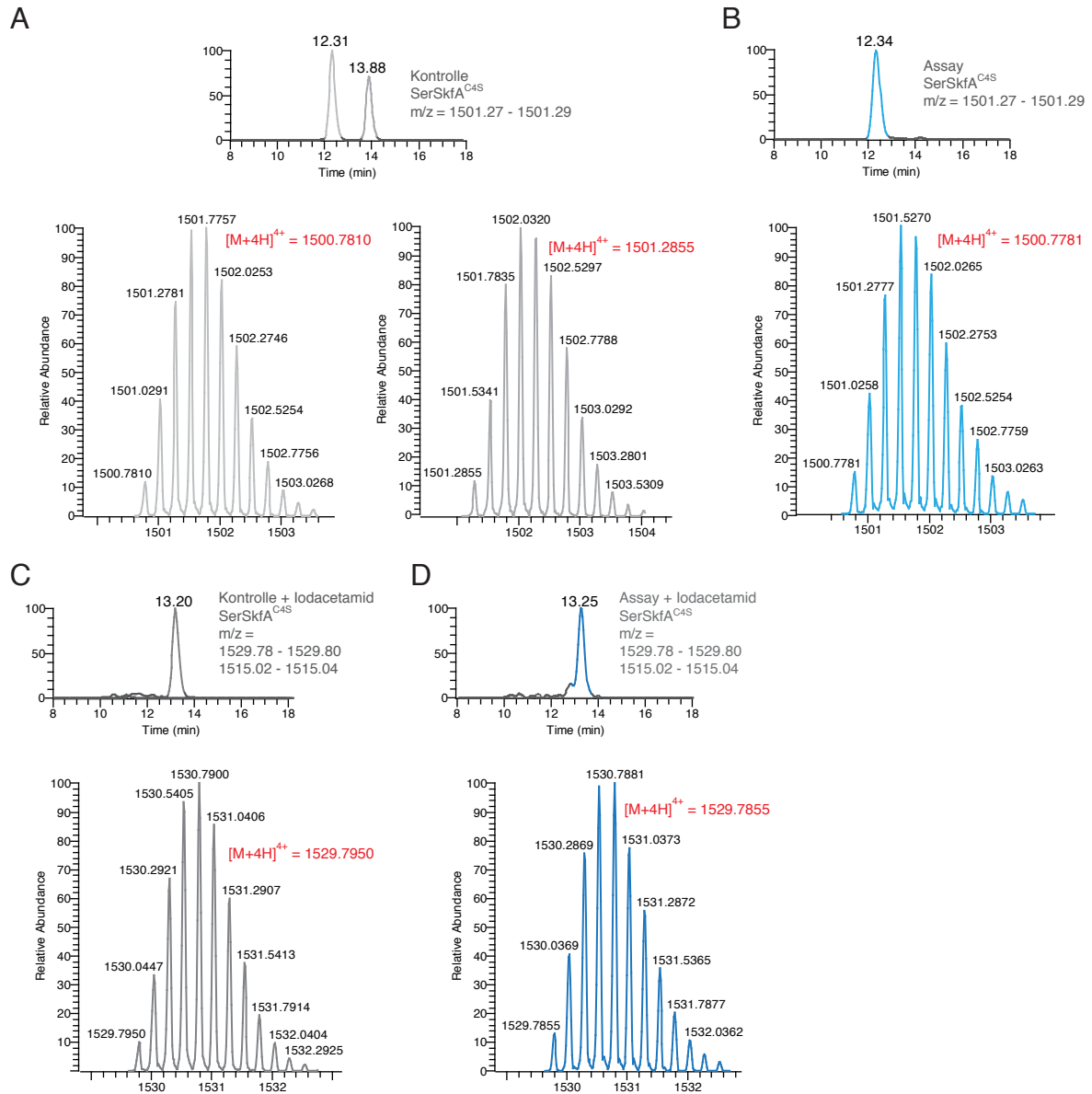


Abbildung 4.22: Detaillierte Übersicht der Ergebnisse der HPLC-HRMS-Analyse der SerSkfA^{C4S}-Modifikationsassays. (A) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Kontrollassays ohne SkfB und detaillierte Massenspektren der detektierten SerSkfA^{C4S}-Spezies. (B) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Kontrollassays ohne SkfB mit Zugabe von Iodacetamid und detailliertes Massenspektrum der detektierten SerSkfA^{C4S}-Spezies. (C) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Assays mit SkfB und detailliertes Massenspektrum der detektierten SerSkfA^{C4S}-Spezies. (D) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Assays mit SkfB mit Zugabe von Iodacetamid und detailliertes Massenspektrum der detektierten SerSkfA^{C4S}-Spezies.

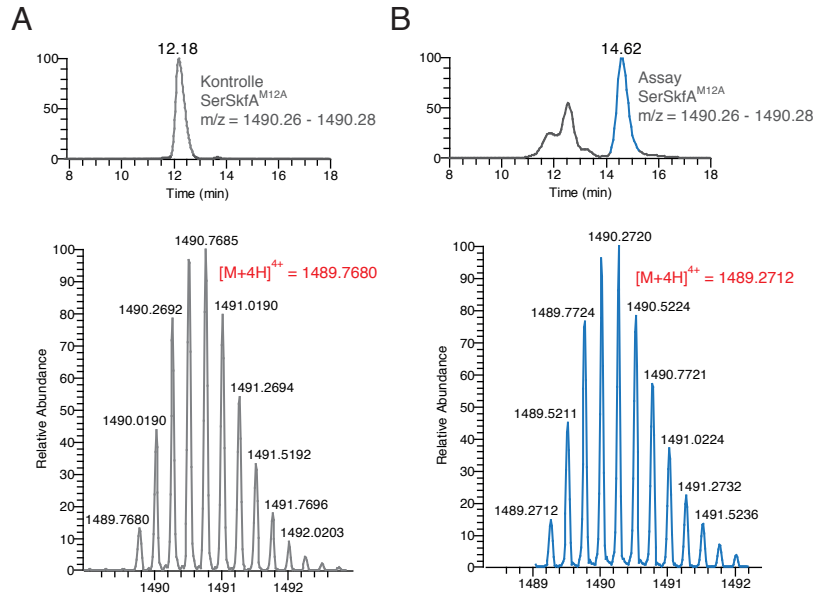


Abbildung 4.23: Detaillierte Übersicht der Ergebnisse der HPLC-HRMS-Analyse der SerSkfA^{M12A}-Modifikationsassays. (A) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Kontrollassays ohne SkfB und detailliertes Massenspektrum der detektierten SerSkfA^{M12A}-Spezies. (B) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Kontrollassays ohne SkfB mit Zugabe von Iodacetamid und detailliertes Massenspektrum der detektierten SerSkfA^{M12A}-Spezies.

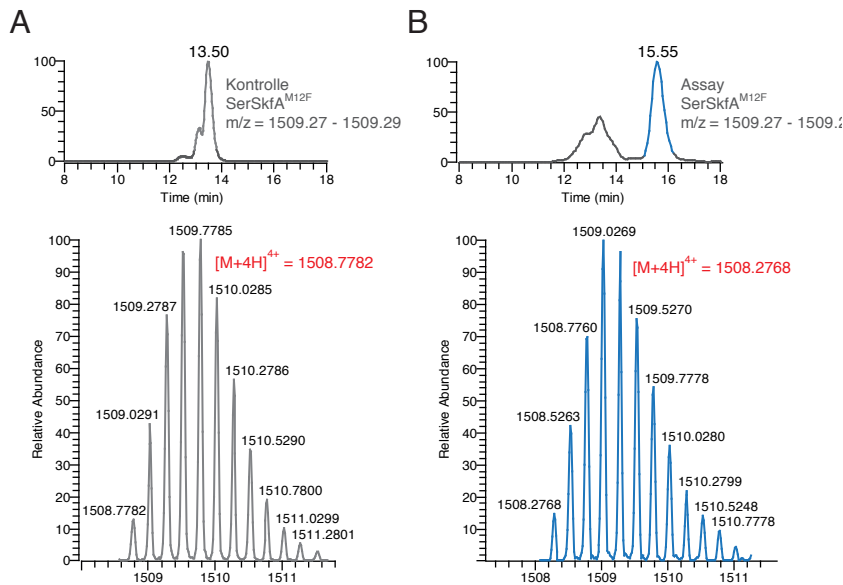


Abbildung 4.24: Detaillierte Übersicht der Ergebnisse der HPLC-HRMS-Analyse der SerSkfA^{M12F}-Modifikationsassays. (A) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Kontrollassays ohne SkfB und detailliertes Massenspektrum der detektierten SerSkfA^{M12F}-Spezies. (B) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Kontrollassays ohne SkfB mit Zugabe von Iodacetamid und detailliertes Massenspektrum der detektierten SerSkfA^{M12A}-Spezies.

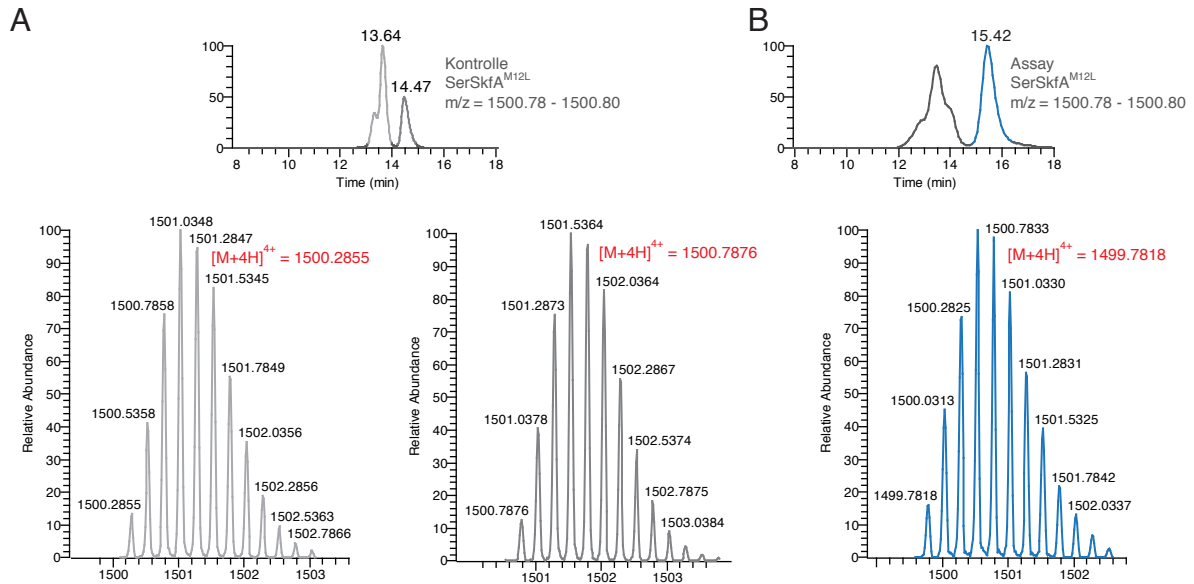


Abbildung 4.25: Detaillierte Übersicht der Ergebnisse der HPLC-HRMS-Analyse der SerSkfA^{M12L}-Modifikationsassays. (A) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Kontrollassays ohne SkfB und detaillierte Massenspektren der detektierten SerSkfA^{M12L}-Spezies. (B) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Kontrollassays ohne SkfB mit Zugabe von Iodacetamid und detailliertes Massenspektrum der detektierten SerSkfA^{M12L}-Spezies.

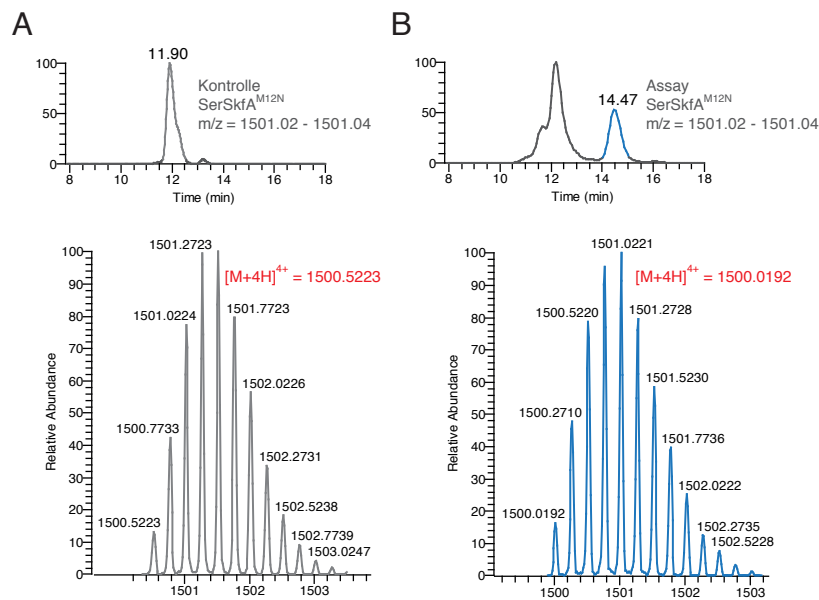


Abbildung 4.26: Detaillierte Übersicht der Ergebnisse der HPLC-HRMS-Analyse der SerSkfA^{M12N}-Modifikationsassays. (A) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Kontrollassays ohne SkfB und detailliertes Massenspektrum der detektierten SerSkfA^{M12N}-Spezies. (B) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Kontrollassays ohne SkfB mit Zugabe von Iodacetamid und detailliertes Massenspektrum der detektierten SerSkfA^{M12N}-Spezies.

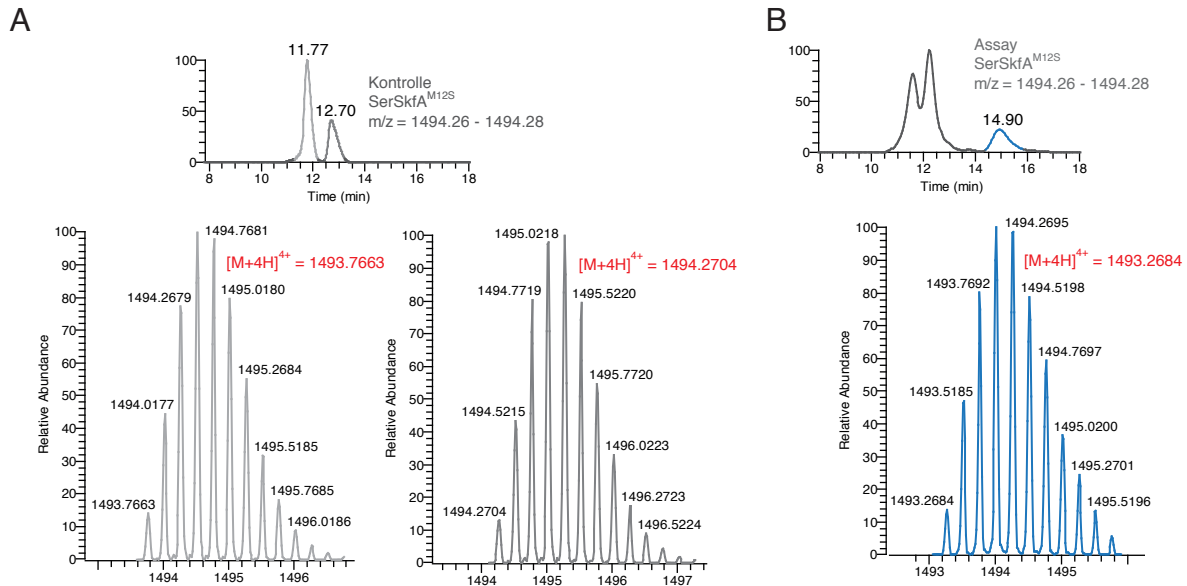


Abbildung 4.27: Detaillierte Übersicht der Ergebnisse der HPLC-HRMS-Analyse der SerSkfA^{M12S}-Modifikationsassays. (A) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Kontrollassays ohne SkfB und detaillierte Massenspektren der detektierten SerSkfA^{M12S}-Spezies. (B) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Kontrollassays ohne SkfB mit Zugabe von Iodacetamid und detailliertes Massenspektrum der detektierten SerSkfA^{M12S}-Spezies.

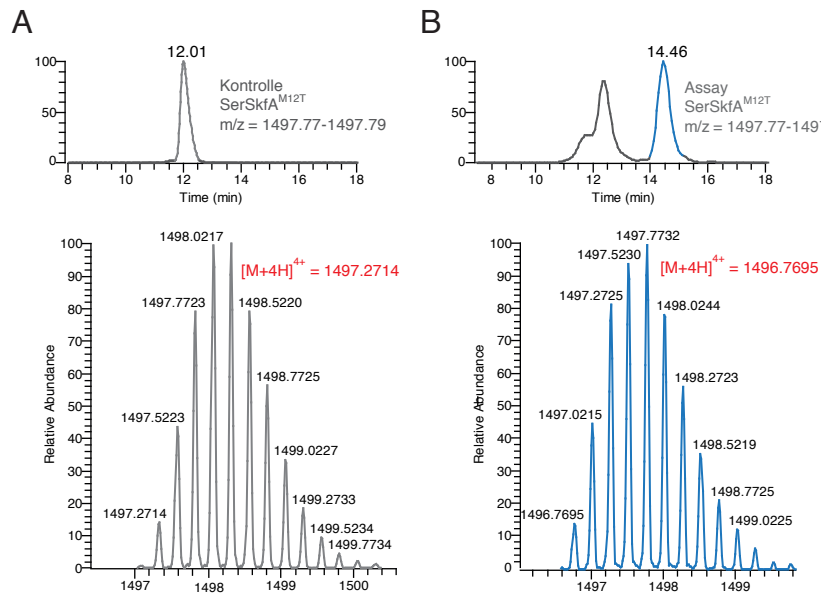


Abbildung 4.28: Detaillierte Übersicht der Ergebnisse der HPLC-HRMS-Analyse der SerSkfA^{M12T}-Modifikationsassays. (A) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Kontrollassays ohne SkfB und detailliertes Massenspektrum der detektierten SerSkfA^{M12T}-Spezies. (B) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Kontrollassays ohne SkfB mit Zugabe von Iodacetamid und detailliertes Massenspektrum der detektierten SerSkfA^{M12T}-Spezies.

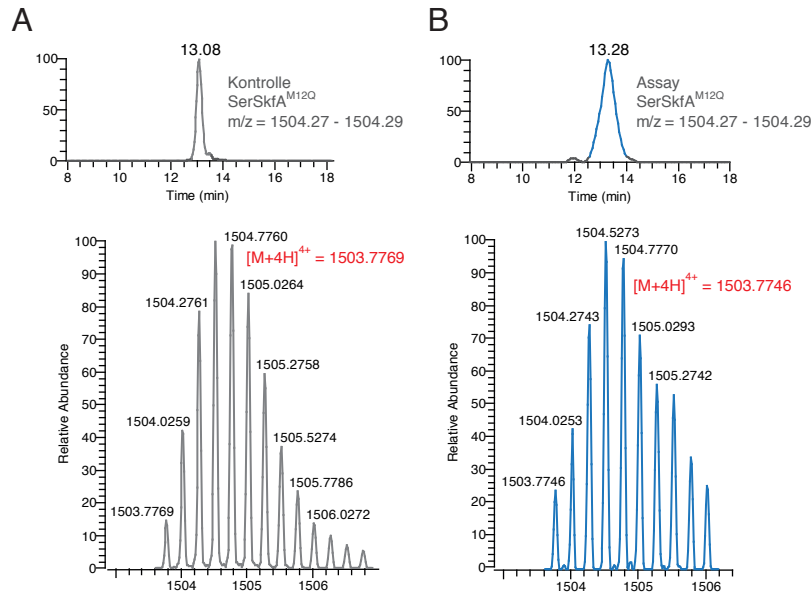


Abbildung A.29: Detaillierte Übersicht der Ergebnisse der HPLC-HRMS-Analyse der SerSkfA^{M12Q}-Modifikationsassays. (A) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Kontrollassays ohne SkfB und detailliertes Massenspektrum der detektierten SerSkfA^{M12Q}-Spezies. (B) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Kontrollassays ohne SkfB mit Zugabe von Iodacetamid und detailliertes Massenspektrum der detektierten SerSkfA^{M12Q}-Spezies.

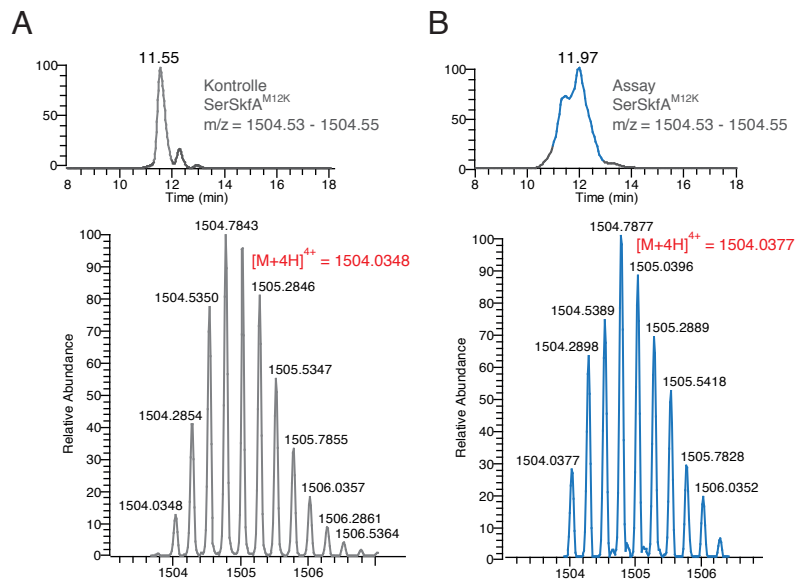


Abbildung A.30: Detaillierte Übersicht der Ergebnisse der HPLC-HRMS-Analyse der SerSkfA^{M12K}-Modifikationsassays. (A) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Kontrollassays ohne SkfB und detailliertes Massenspektrum der detektierten SerSkfA^{M12K}-Spezies. (B) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Kontrollassays ohne SkfB mit Zugabe von Iodacetamid und detailliertes Massenspektrum der detektierten SerSkfA^{M12K}-Spezies.

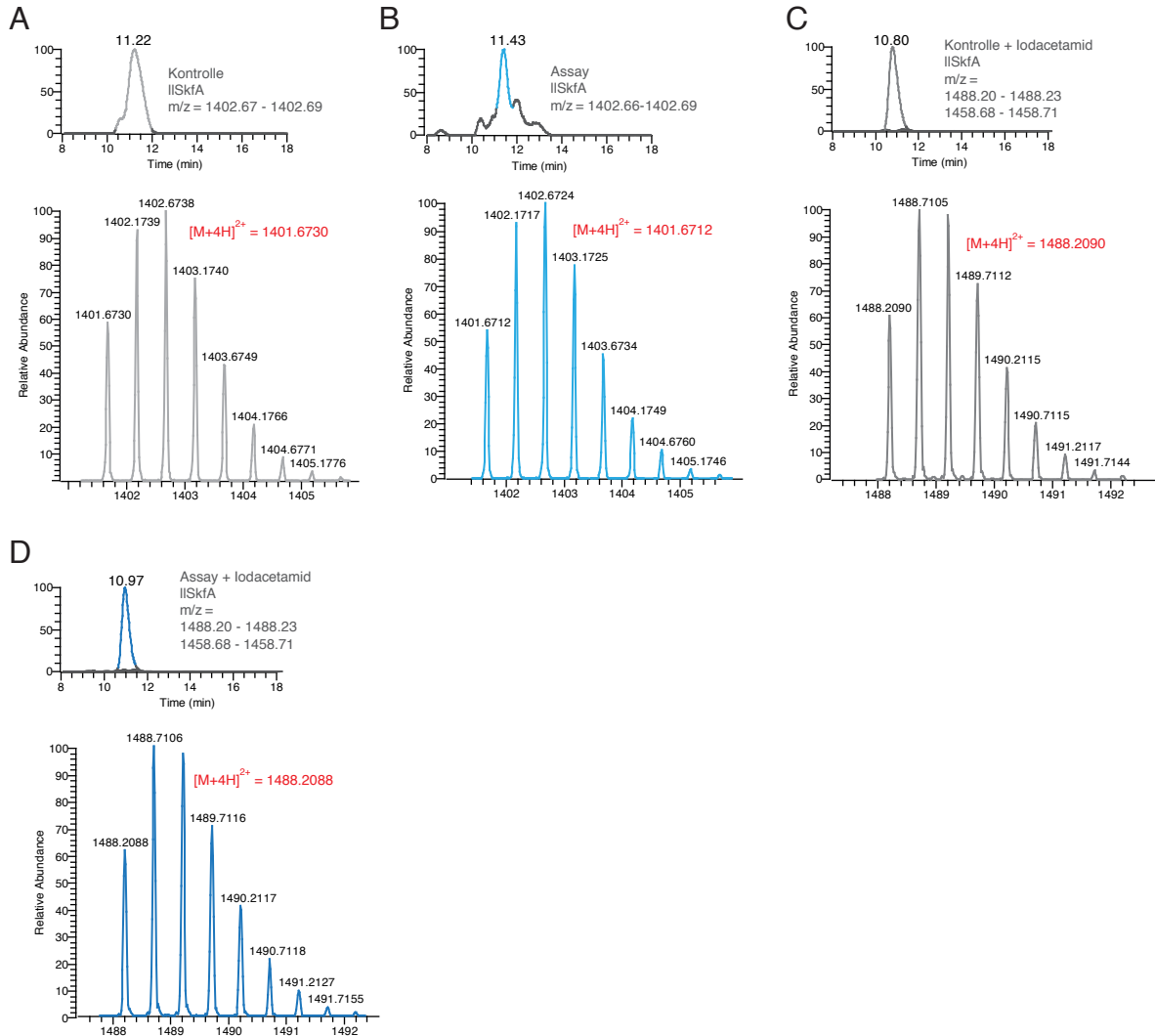


Abbildung A.31: Detaillierte Übersicht der Ergebnisse der HPLC-HRMS-Analyse der IISkfA-Modifikationsassays. (A) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Kontrollassays ohne SkfB und detailliertes Massenspektrum der detektierten IISkfA-Spezies. (B) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Kontrollassays ohne SkfB mit Zugabe von Iodacetamid und detailliertes Massenspektrum der detektierten IISkfA-Spezies. (C) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Assays mit SkfB und detailliertes Massenspektrum der detektierten IISkfA-Spezies. (D) Extrahiertes Ionenchromatogramm des Assays mit SkfB mit Zugabe von Iodacetamid und detailliertes Massenspektrum der detektierten IISkfA-Spezies.

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Marahiel für die interessante wie auch aktuelle Themenstellung und die ausgezeichnete Betreuung meiner Doktorarbeit. Durch seine exzellente finanzielle Unterstützung war es für mich möglich, an einer Gordon Research Conference in Mount Holyoke, Massachusetts (USA) über Radikal SAM Enzyme teilzunehmen. Darüber hinaus gewährte er mir während meiner Doktorarbeit viele Freiräume, die in einem hohen Maße zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Durch sein reges Interesse am Thema wurde das Projekt bestmöglich gefördert.

Herrn Prof. Dr. Buckel danke ich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Prof. Dr. Geyer bedanke ich mich für die Bereitschaft der Prüfungskommission anzugehören.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Thomas Knappe für die hervorragende Betreuung während meiner Diplomarbeit zum gleichen Thema in der AG Marahiel. Ohne seine anfängliche und auch spätere Unterstützung wäre die Arbeit in der jetzigen Form nicht möglich gewesen. Bei Fragen und Problemen hat er mir immer geholfen, besonders als es ans Verfassen meiner ersten Publikation ging, die von ihm in großartiger Art und Weise Korrektur gelesen wurde. Vielen Dank!

Besonders danken möchte ich auch Dr. Uwe Linne und den Mitarbeitern der Massenspektrometrie-Abteilung, ohne die, die in dieser Arbeit durchgeführten HPLC-MS Analysen nicht möglich gewesen wären.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Burghaus für die Aufnahme und Analyse der EPR-Spektren.

Ein besonderer Dank gilt auch Dr. Gunhild Layer, durch die die Kristallisation von SkfB erst möglich wurde. Für ihre fachliche Unterstützung und über nützliche Tips bedanke ich mich herzlichst.

Bei Antje Schäfer und Marcel Zimmermann bedanke ich mich für die anfängliche Einarbeitung in die biochemische Laborarbeit. Dank gilt auch Michael Gattner, der mir das Arbeiten unter anaeroben Bedingungen gezeigt hat. Ebenfalls bedanke ich mich bei Antje Schäfer und Michael Gattner für die Vorarbeiten auf dem Themengebiet. Ohne sie wäre eine schnelle Publikation der Ergebnisse nicht möglich gewesen.

Bei Marcel Zimmermann, Julian Hegemann, Dennis Klug, Dr. Thomas Knappe, Linda Boß und Beata Wieckowski bedanke ich mich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und gute Zusam-

menarbeit im Labor 4716. Bei Beata möchte ich mich darüber hinaus für die Unterstützung während ihres Praktikums in der AG Marahiel bedanken, die es möglich gemacht hat, das SkfB Paper schneller zu schreiben als gedacht.

Christiane Bomm, Antje Schäfer, Gabi Schimpff-Weiland, Anke Botthof und Kristin Ried danke ich für die Übernahme grundlegender Arbeiten.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für die freundliche Atmosphäre, die ständige Hilfsbereitschaft und für viele nützliche Tipps.

Bei Karin und Dirk bedanke ich mich nicht nur für die finanzielle Unterstützung während meines ganzen Lebens. Ihr beide habt mir immer ermöglicht das zu machen, was mir Freude bereitet, so auch das Chemiestudium.

Mein größter Dank geht an meine Frau Lena. Durch deine Unterstützung habe ich es geschafft die bisher schwerste Zeit meines Lebens unbeschadet und gestärkt zu überstehen.

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit vom Januar 2011 bis September 2013 am Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel angefertigt.

Erklärung

nach § 10, Abs. 1 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fachbereiche und des Medizinischen Fachbereichs für seine mathematisch-naturwissenschaftlichen Fächer der Philipps-Universität Marburg.

Ich erkläre, dass eine Promotion noch an keiner anderen Hochschule als der Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Chemie, versucht wurde.

Ich versichere, dass ich meine vorgelegte Dissertation

Studien zur Biosynthese von Sactipeptiden: Charakterisierung der an der Thioetherbrückenbildung beteiligten Radical SAM Enzyme AlbA und SkfB

selbst und ohne fremde Hilfe verfasst, nicht andere als die in ihr angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt, alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate als solche gekennzeichnet sowie die Dissertation in der vorliegenden oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen in- oder ausländischen Hochschule anlässlich eines Promotionsgesuchs oder zu anderen Prüfungszwecken eingereicht habe.

Gehrden, den 03.11.2013

Leif Flühe